

特表平6-502548

第1部門第1区分

(43)公表日 平成6年(1994)3月24日

(51)Int.Cl.  
 C 12 N 15/77  
 A 61 K 39/00  
 39/395  
 C 12 N 1/21

識別記号 ZNA  
 施内整理番号 A 9284-4C  
 A 9284-4C  
 H 9284-4C  
 7236-4B

F I

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全32頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平5-503324  
 (86) (22)出願日 平成4年(1992)7月29日  
 (85)翻訳文提出日 平成5年(1993)3月30日  
 (86)国際出願番号 PCT/FR92/00744  
 (87)国際公開番号 WO93/03158  
 (87)国際公開日 平成5年(1993)2月18日  
 (31)優先権主張番号 91/09652  
 (32)優先日 1991年7月30日  
 (33)優先権主張国 フランス(FR)  
 (31)優先権主張番号 91/09870  
 (32)優先日 1991年8月2日  
 (33)優先権主張国 フランス(FR)

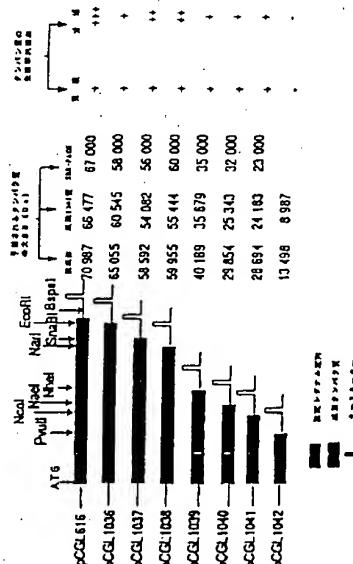
(71)出願人 オルサン  
 フランス国パリ、リュ、パリュ、16  
 (72)発明者 ジョリフ、グワンナエル  
 フランス国パリ、リュ、トリュフォー、48  
 (72)発明者 ギヨンバルシュ、アルメル  
 フランス国ラーイ、レ、ローズ、アブニ  
 ュ、フルーケ、21  
 (72)発明者 レラノ、ビュリフィカション  
 フランス国フォントネ、オ、ローズ、リ  
 ュ、ピエールレ、12  
 (74)代理人 弁理士 佐藤一雄(外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

## (57)【要約】

コリネバクテリアによるアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系である。この系は、そのアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が染色体またはプラスミドDNAの領域内に置かれ、その配列が、蛋白質PS1またはPS2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分(この部分はコリネバクテリア菌株へこの系が取り込まれた時、翻訳後のその蛋白質の分泌を保証する)とともに5'末端に向かって転写されることを特徴とするものである。



## 請求の範囲

1. コリネバクテリア菌株による所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミドDNAの領域内に位置しており、この領域内では該配列が、蛋白質PS1またはPS2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分とともに5'末端に向かって転写され、該部分は、該系がコリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記蛋白質の分泌を保証するものであることを特徴とする、系。

2. 次の構成から成るコリネバクテリアの発現および分泌系であって

- コリネバクテリア菌株と、
- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一種能性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二DNA配列、および上記第一および第二DNA配列の間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三DNA配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証するPS1またはPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードするものである、系。

項1～9のいずれか一項記載の系。

11. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌が、温度、培養液および他の性質によって制御される、請求項1～10のいずれか一項記載の系。

12. コード配列が1つ以上の反復アミノ酸のポリマーをコードする配列である、請求項1～11のいずれか一項記載の系。

13. 反復配列における反復単位が、COOH末端部において正または負に荷電したアミノ酸を含んでなる、請求項1～12のいずれか一項記載の系。

14. ポリペプチドのイオン特性がその準離を可能にする、請求項1～13のいずれか一項記載の系。

15. 荷電したアミノ酸が、特定のプロテアーゼによりペプチドの切断をそのレベルで可能にする、請求項1～14のいずれか一項記載の系。

16. 荷電したアミノ酸が特定のカルボキシペプチダーゼにより除去できる、請求項1～15のいずれか一項記載の系。

17. マーカー遺伝子がcet1A遺伝子である、請求項1～16のいずれか一項記載の系。

18. コード配列が、第17図に対応するgdhAのすべてまたは一部を含んでなる、請求項1～17のいずれか一項記載の系。

## 特表平6-502548 (2)

3. コリネバクテリアの菌株が*Brevibacterium*属に属するものである、請求項1または2に記載の発現および分泌系。

4. 発現のための第一種能性DNA配列がプロモーターおよびリボソーム結合部位を含んでなる、請求項1～3のいずれか一項記載の発現および分泌系。

5. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株中で複数する複数起原を含む自律的に複製するプラスミドにより保持されている、請求項1～4のいずれか一項記載の発現および分泌系。

6. 分泌カセットがコリネバクテリア菌株の染色体へのその組込みを保証するDNAの要素を含む、請求項1～5のいずれか一項記載の発現および分泌系。

7. 上記第三DNA配列がPS1またはPS2のシグナル配列のすべてまたは一部を含んでなる、請求項1～6のいずれか一項記載の発現および分泌系。

8. コード配列の端部の翻訳停止配列、翻訳停止配列およびマーカー遺伝子をさらに含んでなる、請求項1～7のいずれか一項記載の発現および分泌系。

9. 所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、同一相でcsp1またはcsp2遺伝子に挿入されている、請求項1～8のいずれか一項記載の系。

10. PS1またはPS2配列が切形である、請求

19. 発現のための調節性DNA配列が、csp1、csp2またはgdhAの発現要素から選ばれるものである、請求項1～18のいずれか一項記載の系。

20. 発現が塩、代謝産物および他の濃度に依存する、請求項1～19のいずれか一項記載の系。

21. コード配列の発現前において、プロモーターが、csp1、csp2またはgdhAプロモーターから選ばれるものである、請求項1～20のいずれか一項記載の系。

22. マーカー遺伝子がlacZ遺伝子である、請求項1～21のいずれか一項記載の系。

23. 請求項1～22のいずれか一項記載の発現および分泌系を使用して得られる、バクテリア菌株。

24. 菌株がコリネバクテリアである、請求項23に記載の菌株。

25. 菌株がブレビバクテリアである、請求項24に記載の菌株。

26. 菌株が*Brevibacterium lactofermentus*である、請求項25に記載のコリネバクテリア菌株。

27. 所定の蛋白質が、その固定作用を有するPS1またはPS2部位により壁上に固定されている、請求項23～26のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

28. 菌株が、その壁上に固定されたPS1または

## 特にコリネバクテリア中で用いることのできる蛋白質の発現および分泌系

本発明は、特にコリネバクテリア中で使用することのできる蛋白質の発現および分泌系、この系を使用する方法、およびこれら発現系に関連した新規な蛋白質に関するもの。

コリネバクテリアとは、さまざまな菌株によって表示される不規則な形態の一類のグラム陽性バクテリアのことである。

グラム陽性細胞は、外部培地への蛋白質の分泌を容易にする簡単な構造を有するという事実にもかかわらず、コリネバクテリアによる蛋白質の分泌は、今日迄あまり広く研究されていない。毒性<sup>\*</sup>の溶原性ファージ(Smith 1980: J. Bacteriol. 141, 1142頁; Smith等, 1980: J. Bacteriol. 141, 184 頁; Greenfield 等, 1983: PNAS USA 80, 8853頁)に感染した Corynebacterium diphtheriae の特定の菌株によって分泌されたジフェリニア毒素および Corynebacterium glutamicum (V. Liebl等、A.S. Slinkay, 1988: バクテリアの遺伝子学および生物工学、2巻、883-884 頁)による DNAアーゼの分泌に伴う遺伝子のヌクレオチド配列の研究が報告されているに

PS2の抗原エピトープを有する、請求項23~26のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株。

29. アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、請求項23~28のいずれか一項記載のコリネバクテリア菌株を培養液中で培養し、第二DNA配列が上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードし、培養後、上記生成物を、培養液および/またはバクテリア細胞から任意に分離することを含んでなる、方法。

30. PS1またはPS2と融合または別な方法で結合した所定の蛋白質が、表面活性剤を使用してバクテリア細胞から分離される、請求項29に記載の方法。

31. PS1またはPS2配列のすべてまたは一部を含む、蛋白質。

32. PS1またはPS2の抗原部位を含む、蛋白質。

33. 抗原要素として、請求項31または32記載の蛋白質。

34. PS1またはPS2に対する、抗体。

すぎない。

米国特許第4,965,197号は、上記DNAアーゼの下で Corynebacterium に用いることのできる発現および分泌系について述べているが、この場合の蛋白質は主成分ではなく、またこれら条件の下では、対応する分泌系はあまり重要ではないように思われる。

従って、本発明は、特定のコリネバクテリアの培養液上清中に高い割合で存在する二つの蛋白質の分泌のための要素を含むコリネバクテリア型のバクテリアにおける発現および分泌系に関するもの。

本発明は、特にコリネバクテリア菌株により所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現および分泌のための系であって、上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質をコードする配列が、染色体またはプラスミドDNAの領域内に位置しており、この領域内では上記配列が、蛋白質PS1またはPS2のシグナル配列をコードする配列の少なくとも1つの部分とともに5'端部に向かって転写され、上記部分は、系が上記コリネバクテリア菌株に取り込まれた時、翻訳後の上記アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の分泌が保証するものであることを特徴とする系に関するもの。

さらに、本発明は、コリネバクテリアの発現および分泌系であって、

- コリネバクテリア菌株と、

- 上記コリネバクテリア菌株中の発現のための第一選択性DNA配列、アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードする第二DNA配列、および上記第一および第二DNA配列間に挿入された第三DNA配列を含む分泌カセットとを含んでなり、上記第三DNA配列は、上記コリネバクテリア菌株により上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質の分泌を保証するPS1またはPS2から選ばれた蛋白質の要素をコードするもの、である系に関するもの。

まず、本発明の構成において、「コリネバクテリア」とは Corynebacterium 属の菌株のみならず Bravibacterium のような同属のバクテリアの菌株をも指すものと理解すべきである。

本発明の発現系はコリネバクテリア中で自動的に複製するプラスミド中に存在し、この場合、プラスミドは、例えば Corynebacterium の菌株中で検出する複製記録、即ち複製起源PBL1を含むが、また上記発現系は、染色体組込み用に特別に設計された複製不能なプラスミドに保持することもでき、この場合、プラスミドは染色体組換えおよび組込みを可逆にする要素を含んでなる。この組込みの場合、発現系は最終的に上記バクテリアの染色体中に存在する。

特に、染色体組込みの場合、PS1をコードする遺伝子CSP1またはPS2をコードする遺伝子CSP2へ

められる蛋白質 P S 1 および／または P S 2 の一方のプロモーターを使用することも可能である。

また、発現要素は遺伝子の下流領域の発現の調整を保証する DNA 配列を含むこともできる。

良好な効率を保証する要素として、コード配列の末端に 1 つ以上の停止コドンの形の翻訳停止要素、または転写停止要素を配置することが可能である。

分離を保証する要素としては、上記したように、分離特性を変更または喪失することなしに、蛋白質 P S 1 または P S 2 の一方のシグナル配列のすべてまたは一部並びにこれら配列と等価の配列を挙げることができる。

最終的には、点突然変異のような公知の技術を用いて、同様の分離特性を保持しながら分離配列を僅かに変更することが可能であり、従って、本発明はこれら等価の配列をも含むものである。

結論として、本発明による発現系は他の要素、特に転写ターミネーター、例えば蛋白質 P S 1 および／または P S 2 用、もしくは g d h A 用のターミネーターのような要素を含んでいてもよい。

場合によっては、発現および分離配列に蛋白質 P S 1 のすべてまたは一部を導入して、これらの条件の下で分離および発現レベルを改善することのできる融合蛋白質を得ることも有利である。

本発明による発現系は、例えば、E. coli L 中で作

用する上記のような複製起源をコリネバクテリアと異なるバクテリア中で生成する異種要素、また Corynebacter lus への転移を容易にする標識遺伝子のような他の要素を含んでいてもよい。

もちろん、マーカー遺伝子は、コリネバクテリア中で作用する限りにおいて、様々な形のものであってよく、耐性のような正または負の選択用の遺伝子であってよい。しかしながら、現在の研究状況の下では、これら遺伝子は容易に入手できない。従って、CMC\* 表現型を与える Clostridium thermocellum セルロース (cel A) 用の cel A 遺伝子が好ましく使用されるが、他のマーカー遺伝子、特に E. coli L 的 lac Z を使用することも可能である。

マーカー遺伝子が cel A である場合、Bst XI のような適切な制限部位へのコード配列の挿入後、CMC\* 特性のために形質転換バクテリアが選択される。

本発明の方法においては、特にマーカー遺伝子とコード配列との間に制限部位を配置することにより、構造の点検後にマーカー遺伝子を容易に除去できることが好ましい。

コード配列は自然のもの、合成のもの、またはこれらの中間のものでもよい。

本発明の発現および分離系は、もちろん工業的に重要な生成物の生成を保証するように特別に設計されている。

従って、コード配列は、工業的に重要なペプチド、ポリペプチドまたは蛋白質を特別にコードする。しかしながら、このコード配列は、工業的に重要な蛋白質を直接的にコードするのではなくて、工業的に重要なアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の成熟および／または生成を必要とする蛋白質をコードする配列であってもよい。

本発明の方法はアミノ酸配列、特に反復配列の発現のために特別に設計されており、従って、これらは主に合成配列である。

これら図々の生成物をコードするこの第二 DNA は、また分離生成物の成熟を保証するように設計された特定の要素を含んでいてもよい。

合成配列の場合、コード配列を選択することにより次の構成が得られる。

- アミノ酸配列：

- (A<sub>1</sub> … A<sub>n</sub>)<sub>m</sub> の n 個の反復単位を有する反復アミノ酸配列：

- COOH-末端位置 A<sub>1</sub> に正または負に带電したアミノ酸を含む反復配列。このアミノ酸は遺伝子発現を改善するが、次の事項を有利に達成し

(I) 喜しいイオン性によりポリペプチドを単離すること；

(II) 特定の蛋白質によりポリペプチドを (A<sub>1</sub> … A<sub>n</sub>)<sub>m</sub> 単位に切断すること；

## 特表平6-502548 (5)

(III) 必要ならば、特定のカルボキシペプチダーゼにより末端アミノ酸  $\alpha_1$  を除去すること:

- 所望の利点を与えるアミノ酸を  $\text{NH}_2$  - または  $\text{COOH}$  - 末端部分  $\alpha_1$  または  $\alpha_1$  に含有する反復配列。実施例において、発現配列は構造 ( $\alpha_1 - gln$ )<sub>10</sub> および ( $\alpha_1 - gln - lys$ )<sub>10</sub> のポリペプチドをコードする。 $\alpha_1 - gln$  または  $\alpha_1 - gln - lys$  配列はその後の調査処理により放出することができる。調査処理または化学的処理により放出できる  $\text{Ala-Gln-Tyr}$  または  $\text{Ala-Gln-Met}$  のようなこの種の他のポリマーを生成することもできる。

コード配列のコドンの選択は、コリネバクテリア中の発現に影響を及ぼし、約 50-60% の GC 含有量を有する配列を生成することが好ましい。

この例の場合、(AQ)<sub>10</sub>をコードする配列は、GCX-CAG であり、ここで X は A, T, C または G であり、実際これらコドンはアラニンに対して好ましくないが、一方 CAG コドンはグルタミンに対して明らかに好ましい。この場合、GC の含有量は約 75% であり、これは限定期である。従って、含有量を 55% まで減少させるために、第 3 番目は A および T が豊富な 3 つのアミノ酸を含むポリマーの使用が考えられる。

Tyr, Lys および Met はこれらコドンの最初の

2 つの塩基中に 2 つの A または T を有しており、従って、GC の含有量は 75% から約 60% に減少し、コリネバクテリア中に見られる GC の含有量に接近する。さらに、もちろん、グルタミン (Q) の COOH - 末端位置における工業的に重要なこれら 2 つのアミノ酸は、開発され且つ実在するものである。

本発明は、また上記発現および分離系を含むコリネバクテリア菌株に関しており、特に、この場合、上記菌株は Brevibacterium、特に Brevibacterium lactofermentum 菌株である。

最後に、本発明は、アミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質を生成する方法であって、上記コリネバクテリアの形質転換株を培養液中で培養することからなり、第二 DNA 配列が上記アミノ酸、ポリペプチドおよび/または蛋白質をコードし、且つ上記生成物が培養後に培養液から任意に分離されることを特徴とする方法に関する。実際、この方法により、有用な生成物が分離された。従って、この生成物は、この生成物自身を公知の方法で単離することのできる培養液中に存在する。これら公知の方法は例えばクロマトグラフィーまたは選択的沈殿のような分離方法であり、この選択的沈殿は、生成する分子の特性に適応したものであることが明らかに必要である。

また、バクテリア濃縮液を分離し、つぎに、例えば表面活性剤を用いて、この濃縮液から PS 1 または PS 2

と融合または別の方法で結合した所定の蛋白質を分離することも可能である。実際、PS 1 および PS 2 は蛋白質であり、このシステムにより分離した蛋白質の一部は、壁に固定したままであり、このことは、これら蛋白質の分離を容易にする。なぜならばバクテリアは特定の洗浄剤では溶離しないからである。

プラスミドによるコリネバクテリアの形質転換は、エレクトロポレーション (Bonamy C., Guyonvarch A., Reyes, O., David F. および Labios G. PEBS Microbiology Letters, 68, 263-270, (1990)) または他の好適な方法により行なうことが好ましい。

アミノ酸、ペプチドおよび/または蛋白質の生成を可能にする発現条件は、得られた生成物の種類並びに使用した特定の菌株に明らかに依存し、当業者の知識に従って各菌株に対して明確に決定しなければならない要素がある。

また、本発明は、csp1, csp2 および gdhA、これら 3 つの遺伝子のすべてまたは一部の発現用シグナルのすべてまたは一部を含む発現系、並びにこの種の系を発現する菌株、特にコリネバクテリアの菌株に関する。

上記構成物を使用する方法において、所定のアミノ酸、ポリペプチドまたは蛋白質の発現/分離は、温度、培養液および/または SP 1 および PS 2 用の細分の性質、および塩 (特に  $\text{NH}_4^+$ ) の濃度、代謝産物 (グルタミ

ン酸塩) および gdhA を有する系用の細分 (グルコン / フルクトース) によって調整される。

また、本発明は、SP 1 または PS 2 配列のすべてまたは一部を含む蛋白質、特にこれら蛋白質の 1 つ以上の抗原部位を含む蛋白質に関する。上記蛋白質は、また代表的な要素として、特に診断セットとして、対応する抗体と使用することができる。

また、本発明は、所定の蛋白質が下記固定作用を行なう SP 1 または PS 2 部分の壁に固定され、また SP 1 または PS 2 の抗原エピトープが壁上に露呈されているコリネバクテリア菌株に関する。

下記の実施例は本発明の他の特徴および利点を示すことを意図しており、これら実施例はけっして本発明を制限するものではない。

第 1 図はプラスミド pCGL612 の図であり、このプラスミドは、蛋白質 PS 1 を合成する全 csp1 遺伝子を含む *C. metallireducens* ATCC17965 の 2, 6-ヒドロフラグメントを含む pUN121 (Hilssen, B., Uhlen, M., Josephson, S., Catenbeck, S. および Phillipson, L. (1988), An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド仲介突然変異誘発により生成された改良した正の選択プラスミドベクター)、Nucleic Acids Res 11: 1019-1029) から譲

導されたものである。

第2図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicum*のcsp1遺伝子のスクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。スクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。反復スクレオチド配列は四角で囲ってある。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターにおそらくは対応する24-bpペリンドロームは、向かい合う矢印で示されている。この配列は、アクセス番号X66078の下でEMBLスクレオチド配列データバンクで見ることができる。

第3図はcsp1を保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第4図は、*C. glutamicum*の蛋白質PS1および*Mycobacterium*の抗原85複合体の蛋白質の配列の塗り状態を示している。85B M. K. は*M. kansaii* (XIPSG18235) の抗原85-Bを表わす。85B M. b. は*M. bovis* (XIPSC83L79) の抗原85-Bを表わす。85B M. l. は*M. leprae* (EMBLX60934) の抗原85-Bを表わす。85C M. t. は*M. tuberculosis* (ENBLX57229) の抗原85-Cを表わす。85A M. b. は*M. bovis* (XIPSA28544) の抗原85-Aを表わす。85A M. t. は*M. tuberculosis* (XIPSI80082) の抗原85-Aを表わす。配列は「Genetics Computer

Group J (米国、ケイスコンシシ大学) のFastAプログラムを用いて塗り判した。長基の数は各行の始めに各蛋白質に対して与えられている。異なる各蛋白質の間に見られる同様のアミノ酸残基は四角で囲ってある。岡田であると考えられる残基は次の通りである。酸またはアミド (D, E, N, Q) ; 基 (H, K, R, ) ; 植性 (P, A, C, S, T) ; 無極性 (I, L, M, V) および芳香族 (F, W, Y) 。7つの蛋白質の間の同じアミノ酸残基は、関係した残基の上の星印によって表示されている。

注意： 各抗体に対して、アクセス番号は上記データバンクの名前と一緒にカッコ内に表示されている。

第5図はcsp1遺伝子の切断を示している。切断したcsp1遺伝子の染色体への組込み状態が示されている。pCGL613'は*C. glutamicum* 中で複製不可能であり、これはaphA3遺伝子 (K<sub>R</sub>) によって切断されたcsp1 (黒色領域) を含んでいる。wtは*B. lactofermentum* 15野生型を表わし、Δcsp1は切断csp1を含む組み込み体である。

第6図はプラスミドpCGL616の構造を示している。プラスミドpCGL616は、*C. glutamicum*のcsp1遺伝子を有するプラスミドpCGL125に対応する。

第7図は切形蛋白質PS1を合成することのできるア

ラスミドを示している。

ここでは、pCGL616から誘導したベクターの図、期待された蛋白質の大きさの明確、および抗PS1ポリクロナール抗体を使用しウエスタンプロットによる検出(+)または非検出(-)を示している。

第8図はプラスミドpCGL1030の構造を示している。図の領域Aはcsp1およびこれに続くDNA領域を含んでおり、このDNA領域はPS1のシグナル配列およびその成熟配列の最初の30個のアミノ酸に対応している。

第9図はプラスミド1031の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。p+1およびECAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第10図はプラスミド1032の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(AQK) 10およびECAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第11図はプラスミド1033の構造を示している。領域Aは第8図に説明されている。PS1、(AQ) 19およびECAの間の結合領域は連続配列されており、この配列の詳細が示されている。

第12図は、*Corynebacterium melassecola* ATCC 17965と呼ばれている*Corynebacterium glutamicum*

のcsp2遺伝子のスクレオチド配列および対応するアミノ酸配列を示す。スクレオチドの番号は、図面の右側に記載されている。予想されるSD配列には下線が付してある。転写ターミネーターにおそらくは対応する22-bpペリンドロームは、向かい合う矢印で示されている。

第13図はcsp2を保有する*C. melassecola* ATCC 17965の配列DNA領域の制限地図である。

第14図は*C. glutamicum*におけるcsp2遺伝子の切断を示している。切断された遺伝子の染色体組込み状態が示されている。*C. glutamicum* 中で複製不可能であるプラスミドpCGL830は、aphIIIにより切断されたcsp2遺伝子を保有している。aphIIIおよびcsp2遺伝子の転写方向は、プラスミドpCGL830上の矢印によって表わされている。wtは*B. lactofermentum* 15菌株を表わし、csp2:aphIIIは切断csp2遺伝子を有する組み込み体である。

第15図は温度の関数としてPS1のトランスロケーションを示している。34℃での指数増殖期 (OD650-1) における培養液の1.0mlを1分間<sup>35</sup>Sメチオニン (37TBq/mmol, 1.6nM最終濃度) で標識した。パルスの終了時に、クロラムフェニコール (100μg/ml) および次に<sup>32</sup>Sメチオニン (最終濃度0.5μM) を加えた。アリコートの1mlを除去し、所定の温度まで

特表平6-502548 (7)

他の可溶な遺伝子 (DGF1、DGF2) との融合を可能にする celIA 遺伝子の5末端における合成配列

■ : ポリペプチドAQに等価なBstXI部位に導入したヌクレオチド (DGF5、DGF6)

□ : EGAのシグナル配列の一部に等価なDNAの配列

▨ : EGAのコード配列に等価なDNAの配列

△ : 転写ターミネーター

P : EGAのシグナル配列に属する最初のアミノ酸

第22図はpCGL125の構造を示す。

実施例1. 培養液上澄みおよびCorynebacterium glutamicumの壁におけるPS1およびPS2の同定

現在、*Corynebacterium glutamicum*菌株 (Jones, D., およびCollins, M.D. (1988), Irregular aerosporing Gram-Positive rods. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, WilliamsおよびWilkins(eds.), Baltimore, 2巻, 1281-1454頁) と再定義されている *Corynebacterium celassaecola* ATCC17965菌株の培養液上澄みの変性条件 (SDS-PAGE) (Laemmli, U.K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 680-685) の下におけるポリアクリルアミドゲル分析によれば、分子量がそれぞれ

速やかに冷却した。この温度で30分間培養を続け、PS1の分泌型蛋白質を抽出した。次に、この抽出物を SDS-PAGEおよびオートラジオグラフにかけた (a)。バンドの強度は、デンシティメーターにより決定され (b、左側の軸) 且つ34℃で100を基準にして任意の単位で表わされている。トランスロケーションは蛋白質の相転移の開数である。

第16図はgdhA遺伝子の制限地図である。

第17図は*C. celassaecola*のgdhA遺伝子を含むNheI-BglIフラグメントの完全な配列を示す。

第18図はpCGL1441およびpCGL142の構造、およびgdhA遺伝子のプロモータとlacZ遺伝子との間を融合するベクターを示す。

第19図は各構造において用いられるオリゴヌクレオチドを示す。

第20図はpPROK(AQ)<sub>20</sub>celIAの構造を示す。

第21図はptacとcelIAとの間に合成遺伝子が配置されている構造を詳細に示しており、a)はptacの指令下にcelIAを配置した構造であり、b)はポリペプチドAQの導入後の予想できる構造である。

ptac : tacプロモータ

RBS : リボソーム結合部位

▨ : ポリペプチドAQに等価な配列の導入および

約67000および63000のPS1およびPS2の2つの主要蛋白質が明示される。PS1およびPS2の強度は、バクテリアの成長曲線に従い、これらの定常期において最大値に達する。これら蛋白質、特にPS2の大部分の分泌型蛋白質は、バクテリアの壁中にも存在している。壁からPS1およびPS2を抽出するためには、バクテリアを殆ど溶解することのないバクテリアのSDS処理が使用される。従って、PS1およびPS2の最大濃度を得るために、2つの分泌型蛋白質、培養液上澄みおよび細胞型蛋白質を解放し、PS1およびPS2が高い割合で存在する最終標品を得ることができる。ポリクロナール抗体はPS1およびPS2に対して生成され、2つの蛋白質間に免疫交叉反応は存在せず、このことは、これら蛋白質が異なることを効果的に示している。

PS1およびPS2との強い免疫交叉反応性を有する蛋白質は、*Brevibacterium lactofermentum* IS (Bosnassie, S., Oreglia, J., Trautvetter, A., およびSicard, A.M. (1990), Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of *Brevibacterium lactofermentum*, PEWS Microbial Letter 72:143-146)、*Brevibacterium lactofermentum* ATCC21086および*Brevibacterium flavum* ATCC14067菌株のような*Corynebacterium celassaecola* ATCC17965に関するバクテリア菌

株の培養液上澄み中に見いだされた。PS1およびPS2は、インペルターゼ、ペクチナーゼ、ヌクレアーゼ、コラゲナーゼ、アミラーゼ、バクテリオシン、エンドグルカナーゼおよび広域スペクトルプロテアーゼ活性を含む幾つかの酵素活性についてテストされた。これらの酵素活性はPS1またはPS2に包含されていなかった。

実施例2. *Escherichia coli*におけるPS1のシグナルペプチドの作用についての証明 (第1図)

プラスミドpCGL612 (第1図) により保持されたcp1遺伝子E. coli TG1中で発現されると、抗PS1抗体とこの粗抽出物の粗抽出物のウエスタンプロット分析により、*C. celassaecola*の培養液上澄み中に存在する蛋白質PS1と同じ分子量を有する主要蛋白質の存在が明らかになる。わずかに大きな分子量を有する少量の蛋白質もまた検出される。実際、主要な蛋白質バンドは、PS1 (シグナル配列を有せず) およびPS1 (シグナル配列を有する) の前駆体型に対する副次的蛋白質バンドに対応している。

実際、第1の実験において、浸透ショック (Reppel, L.A., (1987), Selective release of enzymes from bacteria, Science 198: 1451-1455) により破壊菌株 E. coli TG1 (pCGL612) のペリプラズミック蛋白質 (分泌した酵素) の放出および抗-PS1抗体使用のウエスタンプロット法による放出蛋白質含有

量の検出は、主要蛋白質のみを示す。この菌株のイソクエン酸塩デヒドロゲナーゼ活性 (Shilo, I., および Ujigawa, K. (1978), Enzymes of the glutamate and aspartate synthetic pathways in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*, J. Biochem 84: 647-657) は、溶菌をモニターする方法で測定した。この実験において、この溶菌は 1% 未満であると見殺もられた。このことにより、結論として主要蛋白質バンドは PS 1 の熟成型に対応し、且つこの蛋白質は *E. coli* の細胞膜を横切って放出される。

#### 第 2 の実験において、粗抽出液 E. coli

TG 1 (pCGL612) の粗抽出物は、蛋白質の合成を抑制するためにクロラムフェニコールの添加の前後に抗-PS 1 抗体使用のウエスタンプロット法により分析された。副次的バンドは蛋白質合成の抑制後次第に消える。クロラムフェニコール CCCP (ローコロフュニルヒドロゾンシアン化カルボニル) の添加 5 分前に、細胞膜を横切る移動力を消散させるプロトノフォア (Protoneophore) が加えられるならば、この副次的 PS 1 のバンドは消失しない。従って、副次的 PS 1 のバンドの消失は、プロテアーゼによる分解の結果ではない。蛋白質合成の抑制後のその漸進的消失およびペリプラズムからのその不在は、膜内に位置されているペプチダーゼシグナル配列および細胞膜を横切るそのransporter

ーションによるこの前駆体形態の成熟の仮説に一致している。また、この結果は、*E. coli* において、PS 1 の成熟が生体内のプロトン移動力に依存していることも示している。

#### 実施例 3. PS 1 をコードする csp1 遺伝子のヌクレオチド配列

上流領域の csp1 と呼ばれている PS 1 - コード遺伝子を含む 2547 基基対のヌクレオチド配列決定を行った。ヌクレオチド配列は第 2 図に示されている。(配列番号: 1)。第 3 図はこの配列領域の制限地図を表している。

コンピュータ分析を行なうことにより、657 個のアミノ酸に対応する 1971 個の塩基対の読み取り枠が確認された。

翻訳 (GAGAAGGAAAACTTCATG) および転写 (TACATA (-35) および TAAAGAT (-10)) を開始する推定シグナルが確認された。上記リボソーム - 結合部位から抽出した AGAACGGA 配列は、グラム陽性型バクテリア、*Staphylococcus aureus* および *Streptomyces lividans* (-5' - G A U C A C C U C C U U U C U O H - 3') の rRNA の 3' 端部に対して相補的である (アンダーライン) (McLaughlin, J.R., Murray, C.L., および Rabieovitz, J.C. (1981), Unique features of the

ribosome-binding site sequence of the Gram positive *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase gene., J. Biol. Chem. 256: 11283-11291) (Bibb, M.J. および Cohen, S.N. (1982), Gene expression in *Streptomyces*: Construction and application of promoter-probe plasmid vectors in *Streptomyces lividans*, Mol Cell Genet 187: 265-277)。翻訳開始コドンの前方の 5' における DNA 領域は、2 つのヌクレオチド配列 AAAAGTTATCCACAG および ATTGAAA AA を含んでおり、これら配列のそれぞれは、最初の場合 28-42 および 70-84 において、二度目の場合 100-108 および 171-179 において二度繰返されている。これら 2 つの配列は csp1 遺伝子の転写の開始範囲内に含まれる。

分泌シグナルの場合、蛋白質の NH<sub>2</sub> 末端における配列は、グラム陽性型バクテリアのシグナル配列の特徴を表わしている (Watson, M.E.E. (1984), Compilation of published signal sequence, Nucleic Acids Res., 12: 5145-5184)。このシグナル配列は、NH<sub>2</sub> - 末端位置における通例の正電荷 (最初の 18 個のアミノ酸中に正電荷を有する 7 個のアミノ酸)、それに続いて過剰の無電性アミノ酸 (次の 23 個のアミノ酸中に 18 個のアミノ酸) を有する配列、さらにそれに続くシグナル配列切断部位の 2 つの推定アミノ酸配列 (28-32 の位置に

おける pro-thr-alanine-alanine) (39-43 の位置における pro-methionine-alanine-serine-alanine) を含んでいる。シグナル配列切断部位のこれら推定アミノ酸配列の間で、後者の配列 - 39-43 の位置における pro-methionine-alanine-serine-alanine は、最も確立が高いように思える。実際、蛋白質 PS 1 は、2 つの異なる方法 (実施例 5 を参照) を用いて電気泳動の結果が同じになるまで、*Corynebacterium glutamicum* の培養液上澄みから精製され、得られた標品は、エドマン分解法によりアミノ - 末端配列を決定するために用いられた。5-neo の純粋な蛋白質を使用したが、シグナルは得られなかった。2 つの精製方法が使用されたので、蛋白質 PS 1 が生体内で選択され、この選択は使用した精製技術の結果ではないと思われる。精製された第 2 の切断配列は、成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン (44 の位置) を明示していると思われ、このグルタミンはエドマン技術によりビログルタミン酸に容易に変換されて、蛋白質のアミノ - 末端配列化を可能にする。

rhod- 依存型の推定ターミネーター部位は、3 つの停止コドン ochrismicopeから 55 個のヌクレオチドの遺伝子の 3' 領域中に見いだされる (Rosenberg, M. および Court, D. (1979), Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA

## 特表平6-502548 (B)

実施例4. *Corynebacterium glutamicum*のPS1と  
*Mycobacterium*の抗原85複合体の蛋白質との間の配列  
相同意性(第4図)

蛋白質PS1のNH<sub>2</sub>部分は、3つの分泌ミコバクテリア抗原85-A、85-Bおよび85-Cにかなり類似している(Closs, O., Harboe, M., Axelsen-Christensen, N.H., and Magnussen, H.(1980) The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system Scand J Immunol 12: 249-283.) (Viker, R.G., Harboe, M., Nagai, S., and Bøgebjerg, J. (1990) Quantitative and qualitative studies on the major extra-cellular antigen of *Mycobacterium tuberculosis* R37Rv and *Mycobacterium bovis* BCG. Am Rev Respir Dis 141: 830-838.)。異なるミコバクテリア種類の3つの対応する遺伝子がクローニングされ且つ配列された。即ち、*Mycobacterium bovis* BCG 1173P2および*Mycobacterium tuberculosis*の抗原85-A(Borremans, H., De Wit, L., Volckaert, G., Doss, J., De Bruyn, J., Buyken, E., Van Vooren, J.-P., Stelandre, H., Verhofstadt, R., and Content, J. (1989) Cloning, sequence determination, and expression of a 32-kilodalton-protein gene of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 57:

transcription. Annu Rev Genet 13: 319-353)。このヘアピン構造のΔGは-3.5, 7-kcal/molに等しい(Freier, S.M., Kierzek, R., Jaeger, J.A., Sugimoto, N., Caruthers, M.H., Neilson, T.およびTurner, D.H. (1986) Improved free-energy parameters for predictions of RNA duplex stability. Proc Natl Acad Sci. USA 83: 9373-9377)。

読み取り枠中に含まれる657アミノ酸に対応する計算上の分子量は70874。しかしながら、最も可能性の高いシグナル配列(アミノ酸の42と43との切断部位)の分子量は4411であり、このことは成熟蛋白質に対して66463の計算上の分子量が与えられ、この値は、皮性ポリアクリラミドゲルに基づいて計算された67000の値にかなり近似している。

配列の特徴をまとめると、次の通りである：

239 ~ 244	TACATA (シグナル - 35)
269 ~ 274	TAAGAT (シグナル - 10)
405 ~ 414	GAGAACCAAA リボソーム結合部位)
420 ~ 2390	コード配列
420 ~ 548	分泌蛋白のペプチドシグナル
2455 ~ 2506	ヘアピン構造、rho-型のターミネーターシグナル

3123-3130.) (De Wet, L., De la Cuvellerie, A., Doss, J., and Content, J. (1990) Nucleotide sequence of the 32 kDa-protein gene (antigen 85A) of *Mycobacterium bovis* BCG. Nucleic Acids Res 18: 3995.)、*Mycobacterium bovis* Tokyo、*Mycobacterium kansassii* および*Mycobacterium leprae*の抗原85-B (Matsu, K., Yamaguchi, R., Yamaoka, A., Tasaka, H., and Yamada, T. (1988) Cloning and expression of the *Mycobacterium bovis* BCG gene for extracellular α antigen. J. Bacteriol 170: 3147-3154.) (Matsu, K., Yamaguchi, R., Yamaoka, A., Tasaka, H., Terasaka, K., and Yamada, T. (1990) Cloning and expression of the gene for the cross-reactive α antigen of *Mycobacterium kansassii*. Infect Immun 58: 550-558.) (De Mendonca Lima, L., Content, J., Van Heuverswyn, H., and Degrave, W. (1991) Nucleotide sequence of the gene coding for the 85-B antigen of *Mycobacterium leprae*. Nucleic Acids Res 19: 3789)、および*Mycobacterium tuberculosis*の抗原85-C (Content, J., De La Cuvellerie, A., De Wit, L., Vincent-Levy-Prebault, V., Doss, J., and De Bruyn, J. (1991) The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG

are members of a gene family: cloning, sequence determination, and genomic organization of the gene coding for antigen 85-C of *M. tuberculosis*. Infect Immun 59: 3205-3212.) *Corynebacterium glutamicum*の蛋白質SP1は、同じ残余σ-1, 1の約33%を有する) および約330個のアミノ酸(+/-5)の長さにわたってこれら6個の蛋白質を有する同様の簇群(σ-1, 1)の約52%。約330個のアミノ酸のこの長さは、ミコバクテリア抗原の場合、蛋白質の全長に対応する。ちょうどPS1のように、すべてのこれらミコバクテリア抗原は、グラム陽性型バクテリア(約42個アミノ酸、σ-2, 4)中に見いだされる最も長いシグナル配列に匹敵する長さのシグナル配列を含んでいる。ちょうどPS1のように、*M. bovis*の蛋白質85-Bおよび*M. tuberculosis*の蛋白質85-Cは、大部分のシグナル配列より長い親水性NH<sub>2</sub>領域(5個以上の正に荷電した残基)を有する。すべてのこれらのシグナル配列の他の重要な特性は、グルタミン酸である*M. tuberculosis*の抗原85-Cを除いて、酸残基、即ちアスパラギン酸の3または5の位置に存在する。酸性荷電残基の存在は、Eukaryoticシグナル配列のNH<sub>2</sub>端部に共通なものであるが、原核シグナル配列のNH<sub>2</sub>端部に対して全く例外的である。(Perlman, D., and Halvorson, H.O. (1983) A putative signal peptid

asrecognition site and sequence in eucaryotic and prokaryotic signal peptides. J Mol Biol 167: 391-409. (Watson, H.E.E. (1984) Compilation of published signal sequences. Nucleic Acids Res. 12: 5145-5164). この特徴の理由は知られていない。他の重要な観察点は、EMBL/MIPSデーターベンクに存在するPS1と他の蛋白質との間に見いだせない。

#### 実験例5. N末端配列の決定に用いられるPS1及びPS2精製操作

##### 操作1:

タンパク質PS1及びPS2をポリアクリルアミドゲルでの調製電気泳動及び電気溶出によりC.グルタミクムATCC17965の培養上液から精製した。

34°Cにおいて富士B培地200mlで培養された細胞を4°Cで15分間8000×gで遠心することにより正常増殖期に収集した。次いで培養上液のタンパク質を6.0%硫酸アンモニウムで沈降させ、4°Cで15分間13000×gで遠心することにより収集した。ペレットをpH 6.8の1.0MトリスHCl緩衝液4mlに溶解し、しかし後溶液をこの同緩衝液中4°Cで24時間透析する。

硫酸アンモニウム沈降後に得られた透析タンパク質抽出液をフォーマット16×20×0.75cmの電気泳動ゲル上に沈着させる。電気泳動は4%濃縮用ゲル及び7.5%分離用ゲルを用いてLaemmli (1970)により記載

る。更に、分離用ゲルを使用する前にブレランする。これらすべての予防処置はタンパク質のN末端を変えて、ひいてはこの末端をプロックする可能性があるラジカルの形成をできるだけ避ける目的で行われる。電気泳動の終了後、タンパク質をPVDF膜上に転写する。この操作はpH 8.0の5.0Mトリス、5.0Mホウ酸緩衝液中5.0V、60分間で行う。次いで膜を位置決定を可能にするアミドブラックで発色し、タンパク質PS1及びPS2に相当するバンドを切出す。次いでそのタンパク質バンドを脱染して、それらをN末端配列決定に用いた(Claessens,U.K.1970. Cleavage of structure proteins during assembly of the head of bacteriophage T4(バクテリオファージT4の頭部のアセンブリーにおける構造タンパク質の開裂). Nature,227:880-885; Lee,C.,Levin,A.,Branton,D.1987.Copper staining:a five minute protein stain for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels(銅染色:ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル用の5分間タンパク質染色).Anal.Biochem.,186:308-312)。

#### 実験例6. PS1-と呼ばれるものはやPS1を含むないコリネバクテリウム・グルタミクム株の産生(図5)

ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム

(*Brevibacterium lactofermentum*) 15と称されるC.グルタミクム株 (*C. glutamicus*) は大腸菌K12の改変

#### 特表平6-502548 (10)

された操作に従い行う。泳動は40mAで15時間にわたり行う。次いでゲルをLeeら(1987)により記載された操作に従い塩化銅で染色する。タンパク質PS1及びPS2に相当するタンパク質バンドを切出し、しかし後完全に脱染する。次いでタンパク質を48mA、4°Cで5時間かけてゲルから電気溶出し、しかし後pH 6.8の1.0MトリスHCl緩衝液で数回透析してから、いくつかのアリコート分画に分け、-20°Cで凍結する。精製収率は90%以上の精度で25%程度である。

##### 操作2:

タンパク質PS1及びPS2を吸収過、電気泳動及びPVDF膜上での転写によりC.グルタミクムATCC17965の培養上液から精製する。

34°Cにおいて富士B培地で培養された細胞を4°Cで15分間8000×gで遠心することにより正常増殖期に収集する。上澄4mlをpH 7.0の5.0Mトリス緩衝液で5.0倍希釈し、しかし後カットオフが3.0kDである吸収過膜で遠心する。このステップによれば80μlタンパク質抽出液を得ることが可能であり、しかし後これを4%濃縮用ゲル及び7.5%分離用ゲルからなる電気泳動ゲルに沈着させる。電気泳動は下記修正を加えてLaemmliにより記載された操作に従い行う。ゲル及び泳動用緩衝液を調製するために用いられるすべての溶液を脱氣させ、これらに0.1Mチオグリコレートを含有させ

DNAに対して許容的であり(Bonnassie,S.,Oreglia,J.,Trautvetter,A.及びSicard,A.M.(1990). Isolation and characterization of a restriction and modification deficient mutant of *Brevibacterium lactofermentum*(ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの制限及び修復欠失変異体の単離及び特徴化). PEWS Microbial Letters,72:143-148)、一方C.メラッセコラ(*C. melassecola*) ATCC17965と称されるC.グルタミクム株は大腸菌のDNAに関して非常に制限的な株である(Rayes,O.,Guyonvarch,A.,Bonamy,C.,Saiti,Y.,David,P.及びLeblon,G.(1991)."Integron"-bearing vectors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive *Corynebacteria*(「インテグロン」-保持ベクター:高制限コリネバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). Gene,107:81-86)。この理由から、B.ラクトファーメンタム15株をcsp1遺伝子の切断子の選択を実施するために選択した。csp1遺伝子の物理的座標はC.メラッセコラATCC17965及びB.ラクトファーメンタム15の場合で同一であることが確かめられた。

カナマイシン耐性( $K_m^+$ )を付与するストレプトコッカス・ファエカリス(*Streptococcus faecalis*)の $\alpha$ -DHA3遺伝子を含むプラスミドpAT21の1.5kbCLal断片(Traou-Cout,P.及びCourvalin,P.(1983).

Nucleotide sequence of the *Streptococcus faecalis* plasmid gene encoding the 3'-5'-aminoglycoside phosphotransferase type III (3'-5'-アミノグリコシドホスホトランスクフェラーゼタイプIII)についてコードするストレプトコッカス・ファエカリスプラスミド遺伝子のヌクレオチド配列 (Gene, 21:331-341) をプラスミド pCGL612 中に存在する csp1 遺伝子の独特な KpnI 部位 (Asp718) に挿入して、プラスミド pCGL613'を得た。プラスミド pCGL613'を保有する組換え大腸菌株が実際に PS1-表型であることは沈PS1ポリクローナル抗体を用いたウェスタンプロットティングにより示された。このプラスミドは C, グルタミクムではなく大腸菌で典型的に複製する。それを電気的形質転換により B, ラクトファーメンタム 15 と称される C, グルタミクムの株に導入し (Bonamy, C., Guyonvarch, A., Reyes, O., David, P., 及び Leblon, G. (1990). Interspecies electro-transformation in Corynebacteria (コリネバクテリアにおける種間電気形質転換), FEBS Microbial Letters, 58:285-270) 、 Km' 形質転換株を選択した。Km' 形質転換株において、プラスミド pCGL613' は宿主ゲノムの csp1 領域との相同的組換えにより C, グルタミクムの染色体中に組込まれるとと思われる。形質転換株の 22.5%において二重組換え現象が生じて、形質転換株プラスミドの csp1 :

p h A 3 相立体による野生型 csp1 遺伝子の置換を起こし、Km' - Tet' 形質転換型をえた (図 5)。BglII 又は BamHI 及び EcoRI のいずれかで切断された野生型株と Km' - Tet' 形質転換株の 1 つとの全染色体 DNA を pCGL613' プローブとのサンプルプローティングにより分析した (Sambrook, J., Fritsch, E. F., 及び Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a Laboratory manual (分子クローニング: 実験マニュアル), second edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Publications)。csp1 遺伝子は野生型株で約 7.5 kb 断片に含まれ、一方組込体 pCGL613' は csp1 遺伝子中に挿入された 1.5 kb s p h A 3 遺伝子に相当する約 9 kb 断片を含む。BamHI - EcoRI 切断から図 5 で示された組込体の構造を確認する。

Km' - Tet' 組込体を沈PS1ポリクローナル抗体を用いて PS1 の產生に関するウェスタンプロットティングでも分析した。この株の培養上液又は粗製抽出物のいずれにもタンパク質 PS1 はない。これは 1gt11 に組込んでクローニングされた csp1 遺伝子が C, グルタミクムで実際に PS1 をコードする独特な遺伝子に相当することを確認させる。

この PS1-C, グルタミクム株は完全に生存可能であり、その増殖速度は影響をうけないようである。この

結果は痕跡的にみて生存力に影響を与えることなく C, グルタミクム株中への相同的又は異種 DNA の組込み用のターゲットとして csp1 遺伝子領域を使用できることを示す。

#### 実施例 7. マルチコピーで csp1 遺伝子の C, グルタミクム中における発現、その合成及びその分泌に必要な P.S1 の重要な領域の分析

この一連の実験のために、プラスミド pCGL616 を構築した。それは全 csp1 遺伝子を含んでおり、プラスミド pCGL1'25 から構築され、これは C, グルタミクムで複製でき、ストレプトコッカス・ファエカリスの spha3 遺伝子を含むクローニングカセットを備えたプラスミド pBL1 (Santamaría, R., Gil, J. A., Masa, J. N., 及び J. P. Martín (1984). Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentans* (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムにおける内在プラスミドの特徴化とクローニングベクター及び形質転換系の開発), J. Gen. Microbiol. 130:2237-2248)、及び大腸菌で複製でき、csp1 遺伝子を含むプラスミド pCSP1G に相当する。この組立てから得られるプラスミド pCGL616 (図 6) は C, グルタミクムで複製できる。

C, グルタミクム PS1 株における PS1 合成の回復

PS1 合成のいわゆる B, ラクトファーメンタム 15 PS1-株における回復はプラスミド pCGL616 の後者への導入後に観察される。プラスミド pCGL616 を保有する C, ラクトファーメンタム 15 PS1-株において、多量に分泌された PS1 は野生型 B, ラクトファーメンタム 15 株 (天然 PS1+) との比較により検出される。これは csp1 遺伝子のコピー数を増加させることにより C, グルタミクム株で分泌される PS1 の濃度を増加させることを示す。

この結果はいわゆる C, メラッセコラ ATCC 17965 株でも証明される。

端部切取り PS1 タンパク質の合成を可能にする pCGL616 に由来するプラスミドの構成 (図 7)

この実験は天然タンパク質に関する 67000 (Nv) の代わりに約 23000 (Nv) に相当する分子量の端部切取り PS1 タンパク質が C, グルタミクムでなお分離されることを示す。

7種の欠失をプラスミド pCGL616 から発見して csp1 遺伝子領域で行い、7種の異なるプラスミドを得た。これらすべての欠失は PS1 のシグナル配列に相当する DNA 領域と csp1 遺伝子の転写ターミネーターを除去している。すべての場合において、端部切取り PS1 タンパク質の合成及び分泌を沈PS1ポリクローナル抗体を用いたウェスタンプロットティングにより分析

ため、成熟 P.S.1 配列の 30 番目のアミノ酸の直後に存在する。結果的に、このアミドは分離が必要な P.S.1 の培養液を離れており、したがって発現及び分離双方の手段に対応している。

#### コリネバクテリウム・グルタミクムにおけるクロストリジウム・サモセルムの c.e.1.A 遺伝子の発現及び対応タンパク質の分離 (図 9)

エンドグルカナーゼ A 又は E.G.A と称されるエンドグルカナーゼについてコードする C. サモセルムの c.e.1.A 遺伝子 (Corset.P., Millet.J., Beguin.P. 及び J.P. Aubert (1983). Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of Clostridium thermocellum coding for endoglucanases (エンドグルカナーゼについてコードするクロストリジウム・サモセルムの 2 つの cel (セルロース分解) 遺伝子の特徴化). Bio/Technology, 1:589-594) を Sma I 部位でベクター p.CGL1030 に組込んでクローニングし、プラスミド p.CGL1031 を得た (図 9)。この c.e.1.A 遺伝子は、キメラ構造の目的でタンパク質 E.G.A の翻訳開始部位の非常に近くに Bst XI 制限部位を人工的に導入したプラスミド p.CGL1008 に由来する (図 10, 11 参照)。タンパク質 E.G.A の合成は C.M.C と称されるエンドグルカナーゼ基質カルボキシメチルセルロースを用いたディッシュにおける酵素活性に関する染色試験によ

#### 実施例 8. c.s.p.1 系に基づき p.CGL1030 と称される C. グルタミクムにおける発現及び分離ベクターの構造 (図 8, 9, 10, 11)

##### プラスミド p.CGL1030 の構造 (図 8)

C. グルタミクムで複製できるこのプラスミド (C. グルタミクムのプラスミド p.BL1 を含む) は、C. グルタミクムの c.s.p.1 遺伝子のプロモーターとシグナル配列に成熟 P.S.1 配列の最初の 30 アミノ酸を加えたものに相当するこの遺伝子の DNA 領域を保持している。マルチクローニング部位 (図 8 におけるポリリンカー 2) は、C. グルタミクムで発現されることを要するあらゆる非相同的遺伝子と同期して容易にクローニングさせる

り容易に検出できる [Corset.P., Millet.J., Beguin.P. 及び J.P. Aubert (1983). Characterization of two cel (cellulose degradation) genes of Clostridium thermocellum coding for endoglucanases. Bio/Technology, 1:589-594]。この C.M.C 試験を C. グルタミクムにおける C. サモセルムのタンパク質 E.G.A の合成を確認するために使用する。富培地 (LB + ルリアプロス又は BHI + 細胞インフュージョン) 中全細胞又は培養上液で実施されるディッシュでの活性に関する C.M.C 試験では、双方の場合においてプラスミド p.CGL1031 を保有するプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 1.5 と称される C. グルタミクム株のエンドグルカナーゼ活性を表す。より高い活性は LB + フルクトース又は + グルコース培地で認められ、これは c.s.p.1 プロモーターの調節下での c.e.1.A の発現へのこれら 2 種の糖の刺激効果を示している。これはザイモグラム (Beguin.P. (1983). Detection of cellulase activity in polyacryl amide gels using Congo red stained agar replicas (コンゴレッド染色寒天レプリカを用いたポリアクリルアミドゲルでのセルラーゼ活性の検出). Anal. Biochem., 131:333-338) 及び抗 E.G.A ポリクローナル抗体と共に培養上液について行われるウェスタンプローティングで確認される。

##### 合成ポリペプチド (A.Q.K) 10 の発現及び分離に関する c.s.p.1 系の使用 (図 10)

10 回反復されるポリペプチドアラニン・グルタミン・リジンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド p.CGL1008 の Bst XI 部位に組込んでクローニングし、プラスミド p.CGL1017 を得た。プラスミド p.CGL1017 の Eco RI 断片を、シグナル配列の c.s.p.1 プロモーター及び P.S.1 の最初の 30 アミノ酸の下流 (及びリポーター遺伝子 c.e.1.A の上流) に位置するプラスミド p.CGL1030 の Sma I 部位に組込んでクローニングし、プラスミド p.CGL1032 を得た (図 10)。キメラタンパク質 P.S.1 - (A.Q.K) 10 - E.G.A の検出をディッシュ中での C.M.C 試験、ザイモグラム又はウェスタンプローティングにより前記されたように行う。

##### 合成ポリペプチド (A.Q) 10 の発現及び分離に関する c.s.p.1 系の使用 (図 11)

20 回反復されるポリペプチドアラニン・グルタミン・リジンに対応する合成遺伝子を化学的に合成し、プラスミド p.CGL1008 の Bst XI 部位に組んでクローニングし、プラスミド p.CGL1002 を得た。プラスミド p.CGL1002 の Eco RI 断片を、シグナル配列の c.s.p.1 プロモーター及び P.S.1 の最初の 30 アミノ酸の下流 (及びリポーター遺伝子 c.e.1.A の上流) に位置するプラスミド p.CGL1030 の Sma I 部位に組込

んでクローニングし、プラスミド p CGL 1033 を得た(図 11)。キメラタンパク質 PS1-(AQ)19-EGA の推出をディッシュ中の CMC 試験、ダイモグラム又はウェスタンプロットtingにより前記されたように行う。プラスミド p CGL 1033 中 B、ラクトファーメンタムにおけるその配列はコード配列 AQ の喪失を示した(B、ラクトファーメンタムでクローニング中 AQ<sub>20</sub> から AQ<sub>19</sub>への置換)。

この一連の実験では csp1 遺伝子のプロモーターがクロストリジウム・サーモセルムの具備 cel1A 遺伝子とキメラ構造 (AQK) 10-cel1A 及び (AQ) 19-cel1A を C、グルタミクム中で発現させることを示す。更に、これらの実験では PS1 の諸要求、この場合ではそのシグナル配列とその後の異種遺伝子の上流に位置する各成熟配列の最初の 30 アミノ酸、が対応産物を分離させることを示す。培地の効果とこの培地への糖、この場合ではグルコース又はフルクトース、の添加又は非添加は対応産物の生産に影響を与える。特に、csp1 プロモーターの調節下 C、グルタミクム中において、EGA 又はキメラタンパク質 (AQK) 10-EGA もしくは (AQ) 19-EGA の産生は LB-I 培地よりも LB 培地で高く、それは LB 培地においてグルコース又はフルクトースで高度に刺激される。C、グルタミクムの csp1 プロモーターは C、サーモセルムの天然 cel1

IA プロモーターよりも強いことがわかる；又原に、天然 cel1A プロモーターを含むいわゆるプラスミド p CGL 602 保有 B、ラクトファーメンタム 15 株は、cel1A が C、グルタミクムの csp1 プロモーターの調節下にある、プラスミド p CGL 1031 を保有するこの回体よりも実質上小さなエンドグルカナーゼ活性を有する。

p CGL 1032 又は p CGL 1033 を含む異なる株の培養上液について行われたウェスタンプロット実験では、いくつかのタンパク質バンドが抗 EGA ポリクローナル抗体と反応することを示す。これらの異なるバンドはエンドグルカナーゼ EGA に特異的であり (コントロールに不存在)、そのタンパク質及びキメラタンパク質の分解産物におそらく相当する。しかしながら、それより高い分子量のバンドも実際に (AQK) 10-EGA (p CGL 1032) 及び (AQ) 19-EGA (p CGL 1033) で密接して (Nv(AQ) 19-EGA > Nv(AQK) 10-EGA) 離離される。

#### 実施例 9. コリネバクテリウム・グルタミクムのタンパク質 PS2 についてコードする csp2 遺伝子のタケレオチド配列 (図 12, 13)

csp2 と称される PS2 をコードする遺伝子を含む 2702 基基對断片とその上流領域の配列決定を行った。タケレオチド配列は図 12 に示される (配列番号版 2)。

図 13 はこの配列決定された領域の制限地図を示す。

コンピューター解析を用いて、1532 基基對断片が 510 アミノ酸に対応することを確認した。

シャイシ・ダルガルノタイプ配列 AAGGAG を翻訳開始コドンのすぐ上流で確認した (-12--17)。

そのタンパク質の NH<sub>2</sub> 末端においてグラム陽性菌の非常にありふれたシグナル配列が 30 アミノ酸で存在する。シグナル配列開始部位の推定アミノ酸配列 His pro ala phe ala が発見された。コリネバクテリウム・グルタミクムの培養上液から精製されたエドマン分解技術によるタンパク質のアミノ末端配列の決定では、5 mol の標的タンパク質を用いたけれども、シグナルが得られなかつた。2つの精製操作を用いたため、タンパク質 PS2 は PS1 と全く同様にインピゴでブロックされるが、そのブロッキングは用いられた精製技術の結果でないようである。30 アミノ酸に関して提高されたシグナル配列は成熟配列の最初のアミノ酸としてグルタミン (31 位) を現すが、これはエドマン技術によるタンパク質のアミノ末端配列決定を不可能にするビログルタミン酸に容易に変換される。このタンパク質 PS2 はその非常に酸性の特性 (pI = 4.1)、そのシスティン残基欠如及びその非常に低いメチオニン残基含有率のようなタンパク質の特徴を有する [Sleytr, U.B. (1978). Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls:

structure, chemistry, assembly and function (細胞壁膜における高分子の規則的配列：構造、化学、アセンブリー及び機能). Int. Rev. Cytol. 53:1-84] [Sleytr, U.B. 及び P. Nezauer (1983). Crystalline surface layers on bacteria (細胞壁上における結晶表面層). Ann. Rev. Microbiol. 37:311-339]。電子顕微鏡分析では PS2 が実際に細胞表面において組織化された六方晶構造で自ら配列できる型タンパク質であることが確認されている。

△ 非依存性タイプの推定ターミネーター部位は停止コドンから 76 タケレオチドでその遺伝子の 3' 領域においてみられる。

その配列の特徴は下記のとおりである：

562~567: リボソーム結合部位

579~2108: コード配列

579~668: 分泌タンパク質のシグナル配列

2188~2233: ヘアピン構造、△ 非依存性タイプの推定ターミネーターシグナル

(停止コドンから 76 タケレオチドに存在)

実施例 10: PS2 と称されるもしくはや PS2 を合成しないコリネバクテリウム・グルタミクム株の產生 (図 14)

csp2 遺伝子の選択は、 $\lambda$  phage の挿入により不活化された csp2 遺伝子のコピーを保持する、コリネバクテリアについての非演習的なベクター、ベクター p

C G L B 3 0 (図 14) (プラスミド p C G L B 1 1 により保持される c s p 2 の独特な N r u I 部位に a p h III 遺伝子を組込んだクローニング) により B. ラクトファーメンタム 1 5 と称される C. グルタミクムで行った。P S 2 シグナルはプラスミド p C G L B 3 0 を保持した大腸菌 T G 1 株に由来する細胞抽出物についての抗 P S 2 ポリクローナル抗体での免疫学的検出により示されなかった。組込まれたクローンは B. ラクトファーメンタム 1 5 株のエレクトロポレーション及び K m に関する選択により選択した。これら組込みのうち、選択遺伝子により野生型遺伝子の置換を起こす二重交換現象を示す T c t <sup>+</sup> クローンを得た。

プローブ p C G L B 1 1 を用いた K m <sup>r</sup> T c t <sup>+</sup> の X h o I 及び S a c I 切断染色体 DNA のサザンプロット分析は野生型株で得られる 2. 7 kb X h o I 及び 0. 7 kb S a c I の代わりに各々 4. 2 kb 及び 2. 2 kb の断片を示すが、これは a p h III 遺伝子の存在と連関したサイズ増加を示す。

異なる分画において抗 P S 2 ポリクローナル抗体でのウェスタンプローティングによる P S 2 の検出の欠如は、B. ラクトファーメンタムにおける c s p 2 遺伝子の選択を確認させる。この P S 2 - 株は完全に生存可能であり、決してその増殖に影響をうけない。c s p 1 遺伝子を保持する C. グルタミクムの染色体の領域と同様

に、c s p 2 遺伝子を保持するこの DNA 領域も細菌の増殖に影響を与えることなく外來 DNA の組込み用ターゲットとして使用できる。

#### B. ラクトファーメンタム 1 5 P S 2 - 株における P S 2 + 表現型の回復

全 c s p 2 遺伝子とその上流の DNA 領域を含む 2. 3 kb S c a I - F i p I 断片をプラスミド p C G L B 2 4 に組込んでサブクローニングし、B. ラクトファーメンタム 1 5 P S 2 - 株に再導入し、P S 2 + 表現型を回復させた。より多量の P S 2 はその遺伝子がマルチコピーで存在する場合に得られることに留意すべきである。これらの結果は C. グルタミクムの c s p 2 遺伝子に由来する分離物の量がその遺伝子のコピー数に従い改変できることを示す。

クリオフラクチャー (cryofracture) により (前記技術により得られた) 株 P S 2 + 及び P S 2 - のサンプルの電子顕微鏡分析は、タンパク質 P S 2 が細胞表面において組織化された六方晶構造で自ら効率的に配列できる型タンパク質であることを非常に明確に示す。

#### 実験例 1 1. P S 1 の分離に関する温度の効果 (図 1 5)

指紋培養期 (3 4 °C) における細胞を <sup>35</sup>S メチオニンで 1 分間かけて標識した。次いでクロラムフェニコール (10 μg/ml) 及び過剰量の冷メチオニン (<sup>32</sup>S) を加えた (時間 0)。次いで細胞懸濁液の温度を変更し

温度まで速やかに調整し、インキュベートを上記温度で 3 0 分間続ける。P S 1 の移動を SDS-PAGE、オートラジオグラフィーにより調べ、密度計測により定量する (図 1 5)。P S 1 の移動は明らかに温度に依存している。移動は 1 0 °C 以下で起きず、それはこの温度を超えて最大約 3 0 °C に達するまで急速に増加する。移動は脂質の相転移と相關している (図 1 5)。

#### 実験例 1 2. コリキバクテリウム・メラッセコラ

##### A' T C C 1 7 9 6 5 に関する染色体 DNA ライブラーーの構成及び g d h A 遺伝子のクローニング

C. メラッセコラの株 A' T C C 1 7 9 6 5 の染色体 DNA を Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (Eds) ((1987) Current protocols in Molecular Biology (分子生物学における現行プロトコール). John Wiley and Sons, New York) により記載された方法に従い得た。制限エンドヌクレアーゼ M b o I (ベーリンガー (Boehringer)) による制御的切断を Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J. ((1982). Molecular cloning: a laboratory manual (分子クローニング: 実験マニュアル). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) により記載された操作に従いこの DNA 1 0 μg で行った。DNA 断片を Ausubel ら (1987) で記載されたようにスクロース勾配でそれらのサイズに従い分離した。サイズ 6

~ 1 5 kb の断片をライブラーー構築用に選択した。

クローニングプラスミド p U N 1 2 1 (Nilsson, B., Uhlen, M., Josephson, S., Catzenberg, S., Phillipson, L. (1983). An improved positive selection plasmid vector constructed by oligonucleotide mediated mutagenesis (オリゴヌクレオチド媒介変異誘発により組立てられた改良陽性選択プラスミドベクター). Nucleic Acids Res. 11:8019-8030) を Dr. B. Bachmann から自由に入手できる大腸菌の株 GM 2 9 2 9 から Birnboim, H. C., Doly, J. ((1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA (組換えプラスミド DNA をスクリーニングするための迅速なアルカリ抽出操作). Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) の方法により得た。そのプラスミドを新規エンドヌクレアーゼ B c l I (ベーリンガー) で直鎖化した。

ライブラーーは B c l I で直鎖化されたプラスミド p U N 1 2 1 1 μg 及び前記 6 ~ 1 5 kb DNA 断片 2 μg の Ausubel ら (1987) により記載された条件下における T 4 DNA リガーゼ (ベーリンガー) での結合により構成した。結合混合物は Dover, V. J., Miller, J. P., Ragsdale, S. C. V. ((1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation (高電圧電気穿孔法による大腸菌の高効率形質転換). Nucleic Acids Res. 16:8127-8145) により記載された操作に従いエレクト

ロボレーションより大腸菌株 DH5 中に導入した。組換えプラスミド保有大腸菌クローニングをテトラサイクリン 10 μg/ml 含有 LB 培地上で増殖できるか否かにより直選択した。全テトラサイクリン耐性クローンのプラスミドを Birnboim 及び Doly (1974) の方法により得た。これらプラスミドの組合せは DNA ライブライリーに相当する。

グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を欠いた大腸菌 CLR 207 recA [Mattaj, J.W., McPherson, M.J., Yoneda, J.C. (1982). Localization of a strongly conserved section of coding sequence in glutamate dehydrogenase genes (グルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子におけるコード配列の強く保存されたセクションの局在化). FEBS Letters, 147: 21-25] を C. メラッセコラ ATCC 17965 DNA ライブライリーで形質転換した。アンビシリソ 100 μg/ml 含有最少選択培地上で増殖できる大腸菌 CLR 207 recA の形質転換クローンを選択した。このクローンは組換えプラスミド pCGL310 を保持する。Meers, J.L., Tempest, D.V., Brovo, C.M. [(1970). Glutamine (amide): 2-oxoglutarate amide transferase oxidoreductase (NADP), an enzyme involved in the synthesis of glutamate by some bacteria (グルタミン (アミド) : 2-オキソグルタル酸アミノトランスフェラーゼオキシドレダクターゼ (NADP)、一部細菌によるグルタミン酸の合成に関与する酵素). J. Gen. Mi-

crobiol. 64: 187-194] の方法に従い測定されるグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は、プラスミド pCGL310 保有大腸菌 CLR 207 recA で回復される。我々のサブクローニングによって、第一に完全 gdhA 遺伝子を保持する C. メラッセコラの DNA 断片を EcoRI 及び XbaI 制限部位により範囲限定される 3.8 kbDNA 断片にまで短縮することができた。この EcoRI - XbaI 断片の正確な制限地図は 図 1-6 で示される。次のサブクローニングによって更に正確に gdhA 遺伝子を 2.2 kb NheI - BglII 断片にまで範囲限定することができた。Southern, B.M. [(1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis (ゲル電気泳動により分離された DNA 断片の中における特異的配列の検出). J. Mol. Biol. 98: 503-517] の方法による DNA - DNA ハイブリッド形成は、クローン化 DNA 断片が実際に C. メラッセコラの株 ATCC 17965 に由来することを示した。

#### gdhA 遺伝子のヌクレオチド配列の決定

前記 EcoRI - XbaI DNA 断片のヌクレオチド配列の決定を実施するため、下記サブクローニングを行った：(1) EcoRI - BamHI で切断されたベクター-M13mp18 (Norrrander, J., Kämpe, T., Messing, J. (1983). Construction of improved M13 vectors us-

ing oligodeoxy-nucleotide directed mutagenesis (ヌクレオチド指向性突変誘発を用いる改良 M13 ベクターの組立て). Nucleic Acids Res. 21: 101-106] への EcoRI - BglII, (2) XbaI - PstI で切断されたベクター-M13mp18 への XbaI - PstI, (3) SalI - BamHI で切断されたベクター-M13mp18 への XbaI - BglII, (4) EcoRI - PstI で切断されたベクター-M13mp19 (Norrranderら. (1983)) への EcoRI - PstI。このため、EcoRI - XbaI 断片に含まれる EcoRI - XbaI 断片の完全ヌクレオチド配列は、Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. [(1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors (鎖終端阻害剤による DNA 配列決定). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74: 5463-5467] の方法により 2 本鎖で決定できる。 gdhA 遺伝子を含む NheI - BglII 断片の完全配列は 図 1-7 で示される (配列番号 No. 3)。

#### gdhA 遺伝子のヌクレオチド配列の分析

NheI - BglII 断片のヌクレオチド配列の分析から下記要素を確認することができる：

a) プロモーター (ヌクレオチド 1 ~ 572)

gdhA 遺伝子のプロモーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる：

・ヌクレオチド 251 ~ 266

α 60 因子 (Herrick, H.J. (1983). Nitrogen control of the αif regulon in Klebsiella pneumoniae: involvement of the ntrA gene and analogies between ntrC and ntrA (肺炎杆菌における ntrA レギュロンの置換コントロール: ntrA 遺伝子の関連性と ntrC 及び ntrA 間の相似性). EXBIO J. 2: 39-44) により認識され及びアンモニウムにより調節されるプロモーターに特徴的な配列 TCG(Pu)A(Pu)NNNNTTGCA と類似性を示すシグナル TGTCATATCTGTGCGC。

#### ・ヌクレオチド 437 ~ 442

ストレプトミセス属のプロモーターの -35 領域に特徴的な配列 TTGAC(Pu) と類似性を示すシグナル TTCACA (Strohl, V.I. (1992). Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomyces promoters (見掛け上ストレプトミセス科のプロモーターに関する DNA 配列の編集及び分析). Nucleic Acids Res. 20: 981-974)

#### ・ヌクレオチド 466 ~ 471

ストレプトミセス属のプロモーターの -10 領域に特徴的な配列 TAG(Pu)(Pu)T と類似性を示すシグナル TAGGAT (Strohl, 1992)

#### ・ヌクレオチド 558 ~ 572

ストレプトミセス属におけるリボソーム結合配列 AAAGCA CGTGATC と類似性を示すシグナル CGGAACCAGGAAATC (Strohl,

hi.1992)

b) コード配列 (スクレオチド 573 ~ 1913)

573 ~ 1913位にわたる既取捨は下記データからみてグルタミン酸デヒドロゲナーゼのそれに相当する：

- この既取捨から求められたタンパク質は447アミノ酸を含み、予想分子量48957ドルトンである。この分子量はC.メラッセコラの株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼ同型物の変性グル電気泳動後に観察されるポリペプチドの場合(48300D)と非常に近い。

- C.メラッセコラのgdhA遺伝子のスクレオチド配列から求められたグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造は、他の生物由来のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの一次構造と強い類似性を有する(Teller,J.X.,Saitoh,R.J.,McPherson,W.J.,Engel,P.C.,Guest,J.R.(1992).The glutamate dehydrogenase gene of Clostridium sibiosum: cloning by polymerase chain reaction, sequence analysis and over-expression in Escherichia coli(クロストリジウム・シムボシウムのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子：ポリメラーゼ鎖反応によるクローニング、配列分析及び大腸菌内過剰発現).Eur.J.Biochem.206:151-159)。

- グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性にとり必須であるとしてBaker,P.J.,Britton,I.L.,Engel,P.C.,Farrant

特表平6-502548 (16)

s,G.W.,Lillier,X.S.,Rice,D.V.,Stillman,T.J.((1992))

.Subunit assembly and active site location in the structure of glutamate dehydrogenase (グルタミン酸デヒドロゲナーゼの構造におけるサブユニットアセンブリー及び活性部位位置).Proteins.12:75-81]により述べられたアミノ酸は、C.メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼ中に存在し、これは Bakerら(1992)により記載された場合に相当する位置である。

- 前記一次配列から求められるC.メラッセコラのグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造は他の生物のグルタミン酸デヒドロゲナーゼの二次構造と強い類似性を示す(Tellerら,1992)。

c) ターミネーター (スクレオチド 1937 ~ 1977)

gdhA遺伝子のターミネーターはそれが下記構造要素を含むことで特徴付けられる：

AG - - I 3, 6 kcal/molでGCペアリングに富むヘアピン構造を形成できる配列CCCTGATCCGCCTTAAGTCAGCGとその後のTに富む配列TTATTGATTTCTT。このような構造はp非依存性ターミネーターに特徴的である(Rosenberg,K.,Court,D.(1979).Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription(RNA転写の促進及び終結に関与する調節配列).Ann.Rev.Genet.13:319-353)。

C.メラッセコラのgdhA遺伝子の発現の調節

C.メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現の調節はこの株が培養される培地の性質の間接としてグルタミン酸デヒドロゲナーゼ特異活性の変動を測定することにより研究された。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性は超音波処理で得られたC.メラッセコラの無細胞抽出物からHeersら(1970)の方法により測定した。

この研究に用いられた培地は、ベースがLiebel,Y.,Klaeser,R.,Schleifer,K.H.((1989).Requirement of chelating compounds for the growth of Corynebacterium glutamicum in synthetic media(合成培地中コリネバクテリウム・グルタミクムの増殖に関するキレート化合物の要求).Appl.Microbial.Biotechnol.32:205-210)により記載されたものである合成培地である。下記改変を加えた：

- 成長源は、最終1.1g/lでグルコース(培地1,2及び4)であるか又は1.0g/lでフルクトース(培地3)である。

- NH<sub>4</sub><sup>+</sup>イオンの濃度は培地1,3及び4で1.25 mMである。それは培地2で1.25mMである(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>を制限する)。

- 培地4は最終5.0g/lのL-グルタミン酸を含有する。

前記の異なる培地で培養されたC.メラッセコラ株ATCC17965のグルタミン酸デヒドロゲナーゼに關して測定された特異活性は下記表に示される。その活性は形質転換されたNADPH2μmol/min/mgタンパク質で表されている。

培地	培地1	培地2	培地3	培地4
gdhA	4.4+/-0.3	23.2+/-1.1	18.2+/-1.8	2.8+/-0.2

この表によってC.メラッセコラATCC17965のgdhA遺伝子の発現調節の下記3タイプを確認することができる。

- グルタミン酸による発現の抑制(倍率1.57)

- 過剰アンモニウムによる発現の抑制(倍率5.27)

- グルコースによる真性抑制(フルクトースとグルコースとで倍率4.13)。異化抑制のケースにおいて、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコンターゼ及びクエン酸シンターゼ群活性も影響をうけることに留意すべきである。

gdhA-lacZ融合ベクターの構造

グルタミン酸、過剰アンモニウム及びグルコースによるgdhA遺伝子の調節の軽易特性をC.メラッセコラで調節して、これらの調節に付されないC.メラッセコラの変異株を簡単に選択しうる手段を有するために、gdhA遺伝子の翻訳開始用プロモーター及びATGコード

シと、最初のアミノ酸が lacZ 遺伝子の領域から消失された大腸菌の lacZ オペロンとの構成体を作製した。この融合は下記のように行なった：

- gdhA 遺伝子のプロモーターを含む EcoRI - BspHI 断片の単離

- BspHI 水槽からプラント水槽への変換

- EcoRI 及び SmaI で置換されたベクター pMC14-03 (Casadaban, M.J., Chou, J., Cohen, S.N. (1980). In vitro gene fusions that join an enzymatically active  $\beta$ -galactosidase segment to amino-terminal fragments of exogenous proteins: Escherichia coli plasmid vectors for the detection and cloning of translational initiation signals (酵素活性  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性と外因性タンパク質のアミノ末端断片に結合させるインビトロ遺伝子融合：翻訳開始シグナルの検出及びクローニングに関する大腸菌プラスミドベクター) . J. Bacteriol. 143: 971-980) に組込まれて得られた断片のクローニングでプラスミド pCGL14-3 を得る

- 前記 gdhA プロモーター - lacZ 融合体を含む pCGL14-3 の NheI - SalI 断片の単離と SpeI 及び SalI で置換されたベクター pCGL24-1 (Reyes, O., Guyonvarch, A., Bonamy, C., Saltit, V., David, F., Leblon, G. (1991). "Integron" bearing vect

ors: a method suitable for stable chromosomal integration in highly restrictive Corynebacteria ("インテグラロン"・保持ベクター：高制限コリネバクテリアにおける安定的染色体組込みに適した方法). Gene. 107: 81-88) に組込んだクローニング、こうしてプラスミド pCGL14-0 を得る (図 1-8)

- gdhA - lacZ 融合体とカナマイシン耐性を付与する  $\lambda$  phIII 遺伝子を含む pCGL14-0 から単離されたインテグラロンのベクター pCGL12-5 への導入によって pCGL14-1 及び pCGL14-2 を得る (図 1-8) . プラスミド pCGL14-1 及び pCGL14-2 を形質転換で C. メラッセコラ ATCC17965 に導入した。 gdhA - lacZ 融合体の構造は pCGL14-1 及び pCGL14-2 で形質転換された C. メラッセコラの株 ATCC17965 における  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性、即ち pCGL12-5 で形質転換された同株に存在しない活性の検出により示された。  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は免色原基質 X-gal (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル  $\beta$ -D-ガラクトビラノシド) を含有する完全固体化培地 (BHI, ジフコ (Difco)) で細胞を培養することにより検出される。  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を有する細胞に由来するコロニーはこのような培地で青色になる。最終 1.5 g/l まで寒天を加えることで固体化され、最終 2.5 g/l までカナマイシン及び

最終 1.00 mg/l まで X-gal で補充された前記培地 1, 2, 3 及び 4において pCGL14-1 及び pCGL14-2 で形質転換された細胞を培養することにより、我々はこれら異なる培地で得られる細胞コロニーが酵素測定で示される眞菌と適合する着色勾配を有することから gdhA 遺伝子の眞菌が実際に転写タイプであることを示すことができた。実際に、培地 4 で得られるコロニーは強度増加順に培地 1, 3 及び 2 で得られる場合よりも深い青色である。我々はこの差異が培地 1 及び培地 4において pCGL14-1 で形質転換された C. メラッセコラの培養物に関する  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性の酵素測定レベルで反映されることを示した (グルタミン酸による抑制)。

培地	培地 1	培地 4
$\beta$ -gal特異活性	0.118	0.052

$\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は C. メラッセコラの無細胞抽出物から Miller, J. H. (1972) (Experiments in molecular genetics (分子遺伝学における実験), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York) により記載されたように測定した。

異化抑制で消失した変異株の選択

C. メラッセコラ ATCC17965 に由来する株の NTG 変異消除を実施した。この変異消除から、第一の選択をグルタミン酸アナログ、4-フルオログルタミン

酸に対する耐性の基準に基づき適用した。このアノログに耐性の変異株は非異化抑制剤を含めた異なる種に属するかもしれない。実際には、このような変異株において、グルタミン酸デヒドロゲナーゼの特異活性に関する増加は細胞内グルタミン脱の過剰産生とひいては毒性アノログの発現、しだがって耐性の現象を起こすことが予想できる。4-フルオログルタミン酸耐性変異株を一緒に分離し、細胞の組合せを pCGL14-1 での形質転換に付した。形質転換細胞を X-gal 及びカナマイシン含有固体化培地 1 でプレート培養した。最も強度の青色を有する細胞コロニーを単離し、カナマイシン含有液体培地 1 で培養した。グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を無細胞抽出物から測定し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を全トルエン処理細胞から測定した (Miller, 1972) . 選択された変異株の 1 つに関して得られた結果は以下で表される。

活性	グルタミン酸 デヒドロゲナーゼ	$\beta$ -ガラク トシダーゼ
コントロール	8.3	10.79
変異株 90	12.1	23.88

したがって得られた結果は、構築された手段で gdhA 遺伝子周辺に関する変異株の表現型スクリーニングにより選択できることを実験に示す。単純にカナマイシン選択圧の非存在下で培養することにより、選択後に細胞

e I - N c o I 断片の形で c e l A のコード領域を含む断片を除去することができる。このステップは 3' で未確定配列を欠く c e l A 遺伝子を育することも可能にする。

H i n d I I I - E c o R I 断片の形における c e l A のクローニングを、大腸菌 T G 1 保有株を用いてプラスミド p M T L 2 3 に組み込み実施した。このプラスミドを保有する大腸菌株は実際に E G A の発現に関連する C M C + 表現型を保有する；得られた制限断片の分析は予想されたものと一致する。

p P R O K - c e l A の構造(図 20)は下記のとおりである：

クロントック・ラボラトリーズ社(Clonotech Laboratories, Inc.) (バロアルト, CA, U.S.A.) から入手できる 4.6 kb プラスミド p P R O K - 1 を用いる。

t a c プロモーターを含む大腸菌で複製できるこのプラスミド(Brossius et al. Gene, 27:191, 1984)を E c o R I - N c o I で加水分解する。

次いでこの制限中に E c o R I プラントの形で図 19 のアダプター-D G F 1 / D G F 2 を導入するが、これらのアダプターは B s t X I 部位を形成する。次いで c e l A を前記構成体から N a e I (プラント) - N c o I の形で導入する。

こうして得られたプラスミドは p P R O K - c e l A

から p C G L 1 4 1 及び p C G L 1 4 2 を除去することが非常に容易であることに留意すべきである。

#### 実験例 13. ベブナドのクローニングを可能にするプラスミドの構造

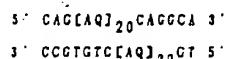
この構造のため、c e l A サブクローニングステップを実施した。プロモーター領域、その遺伝子及びもう1つの未確定遺伝子の開始部分を含む 3.5 kb H i n d I I I 断片の形で利用できる c e l A 遺伝子を、未知遺伝子断片から欠失された 2.6 kb H i n d I I I - E c o R I 断片の形で大腸菌の複数ベクター p M T L 2 3 に組み込んでサブクローニングした [Chambers, S.P., Prior, S.E., Barstow, D.A. 及び Watson, N.P. (1988). The pMTL micro-cloning vectors. I. Improved pUC polylinker regions to facilitate the use of sonicated DNA for nucleotide sequencing (p M T L - n i c ) - クローニングベクター. I. ネクレオチド配列決定のために音波処理 DNA の使用を容易にする改良 p U C ポリリンカー領域]. Gene, 68:139-149]。

E c o R I 部位をその遺伝子の転写ターミネーターの直後に指向性変異導入により導入した。この中間サブクローニングは、制限部位が導入されたとすれば、次のクローニングステップに必要である；特に、p M T L 2 3 ポリリンカーに組み込むクローニングでは E c o R I 部位直後に N c o I 制限部位を導入できるが、これは N a e I 部位

と称される。それはアダプター-D G F 1 / D G F 2 により導入された B s t X I 部位で分離される t a c プロモーターの調節下で c e l A 遺伝子を含む。

#### 実験例 14. マルチ A Q 配列の発現を可能にするプラスミドの組立て

20 A l a - C l n (A Q) 単位についてコードする配列の導入を実施するため、D G F 5 / D G F 6 と称される合成オリゴヌクレオチドの第二対を用いたが(図 19)、そのオリゴヌクレオチドは下記合成遺伝子に相当する：



(A Q) は Ala-Gln についてコードする配列を表す。

D G F 5 及び D G F 6 配列の末端は B s t X I 部位と適合し、したがってその配列はこの部位でクローニングできる。

D G F 5 及び D G F 6 末端の配列は、一方でそれらがそのクローニング方向に向き、他方でそれらがクローニング後に B s t X I 部位を残すような配列である。

非リン酸化アダプターの使用によれば遺列ないくつかの合成遺伝子の導入をかけることができる。

B s t X I による p P R O K - c e l A (図 20) の切断及び合成遺伝子の結合後、図 20 で表される構造を有する p P R O K (A Q) 20 c e l A が得られる。

図 21 は A Q / E G A 融合部位の構造を更に詳細に表

し、用いられる B s t X I 部位の重要性を示す。この部位の構造は以下である：



それは A T G 開始コドンとアラニンコードコドン G C A 及び決められたコード配列の後にメチオニン導入用の第二 A T G コドンを含むことが観察できる。

アダプター-D G F 5 / D G F 6 の導入は一方のみで起き、関心ある対象にとり外来である塩基を導入しない。

このプラスミドを B s t X I で処理し、同酵素で処理されたプラスミド p C G L 1 2 5 の制限産物との結合により処理する。プラスミド p C G L 1 2 5 (図 22) は複型起承 p B L 1 を含むプレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 1 5 の風船的プラスミドである。

本発明による株はプラスミド(p C G L 1 2 5 - (A Q) 20 - c e l A) (p C G L 1 0 0 2, 図 11) での上記株の形質転換及び形質転換株の選択により得られる。

実施されたすべての場合において、翻訳は (A Q) 20 以前のメチオニンで始まる； (A Q) 20 を C O O H 末端でメチオニンと置換させる予防措置も払われる；タンパク質 c e l A と融合された又はそうでないポリペプチド A Q の検出は融合タンパク質の部分的精製と臭化シアン加水分解又はその後の後に特異性抗体により又は分析検出により実施できる。反復ベブナドの特異的性質は容易に分離可能にする。

記載された株は下記起原である：

大腸菌

- CLB207 reca B. バックマン (B.Bachman)
- DMSa ギブコ B R L (Gibco BRL)
- GN2929 B. バックマン
- TCI パスツール研究所 (Institut Pasteur)

ブレビバクテリウム・フラブム

- ATCC 14067 ATCC

コリネバクテリウム・グルタミクム (ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム)

- 15 S. ボナシー (S.Bonassie)
- ATCC 21088 ATCC

コリネバクテリウム・グルタミクム (コリネバクテリウム・メラッセコラ)

- ATCC 17965 ATCC

D B 5 株はクロンティック・ラボラトリーズ (the clonal laboratories) のカタログ No C 1 0 2 1 - 1 (Palo Alto, CA, USA) から入手できる。

ATCC 株は 1 2 3 0 1 パークローン・ドライブ, ロックビル, MD 2 0 8 5 2, USA のアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション c/o セールズ・アンド・マーケティング部門 (American Type Culture Collection c/o Sales and Marketing Department) から入手できる。

配列番号：1

配列の型：ヌクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ：2 5 4 7 基基対

塩の数：5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノム DNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium melassecola)

株名：ATCC 17965

互換の実験原：クローン pCSPIC

配列の特徴

239-244 TACATA (signal - 35) (S)

269-274 TAAGAT (signal - 10) (S)

405-415 GACAAGGAAAAA リボソーム結合部位 (S)

420-2390 コード配列 (S)

420-548 分泌タンパク質ペプチド (S)

2455-2508 ヘアピン構造の依存性ターミネーター

シグナル (S)

関連生物活性：コリネバクテリウム・メラッセコラ及び  
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの細胞外  
タンパク質 PS 1 の前駆体

ミコバクテリウムの細胞外抗原 85 構合体のタンパク質  
の前駆体のホモログ

株を 1991 年 7 月 23 日付でパスツール研究所 (パリ) のコレクション・ナショナル・デ・カルチャーズ・デ・マイクロオーガニズムス (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) (C N C M) に寄託した。  
• No I - 1 1 2 6 としてブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム 1 5 (C C L 2 0 0 5 (B 1 1 5))

AAGCTTCAGGGAAAGAACAGGGGCTT	TTAAGTTATCCACAGATCCCGAAGTC	52
ATCCGGCACTGGGTGAAAGTTATCCACAGA	GAACCGGAGGGGGGGATTGA	104
AAATTCAGGCAAATGCGCAAAGGTGCGAGGGAAATGCTGCCAGTC	TCTTGCGG	156
ATCCCCGGCGTGGCATTTGAAANAGCTTAAGATTGAGCTTAAAGATTGAGGTC	208	
ATTCGAGCTGTGACCTGCATCAAGAACGTTACATAACCACATATGTAAACC	250	
TTCTGGACTAAAGATCACCAACAGACTGAAAGAACGACTGAAAGACTCTCAGGCAT	312	
AGCCCACGTGTGTTGCGGGCCGAAAGCGGGGAACTTCGGGACGGGCTTA	364	
ACTCATGGGGGCTGTGGCAGTATCCAAUATCAGAAATGAGAAAGCAGAAC	416	
TTC ATG CGC GAC ACC GCA TTG CGT TCC ATC AAG CCT AAA	455	
Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys		
GCT CAG GCT AAG CGC CGT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC	494	
Ala Glu Ala Lys Arg Ser Leu Tyr Ile Ala Ala Gly		
GCT GTG CCA ACC GCA ATT GCG TTG ACT ATG TCC CTG GCA	533	
Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala		
CCT ATG CCT TCG CCT CAG AAC ACC CTT TCC TCT GAT	572	
Pro Met Ala Ser Ala Glu Ser Asn Leu Ser Ser Asp		
GCC GTC GTC ACC AGC GGG CAG GGC GTC ACC GAT GGC	611	
Ala Val Val Gly Ser Ile Ala Glu Gly Val Thr Asp Gly		
CTG ACT GAC TAC CTG AAC CCT CCC GTC GAG CTT CCT	650	
Lys Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Asp Val Glu Glu Leu Pro		
GCT GGT GAA GTC ACC TAC CCA GAG ATC GCC CCC CTG CCT	689	
Ala Glu Val Thr Tyr Pro Glu Ile Ala Glu Leu Pro		
GAT GGT GTG CGC GTG ATC ACC GCT CAG TGG GCA ACC TCC	728	
Asp Glu Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Tyr Ala Thr Ser		
AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CAG TCT GCA GCA ATG CCA	767	
Lys His Val Ile Leu Thr Ile Glu Ser Ala Ala Met Pro		
GAG CCC CCA ATC AAC GTG CAG CTG CTG CTT CGG CGT GAC	806	
Glu Arg Pro Ile Lys Val Glu Leu Leu Leu Pro Arg Asp		
TGG TAC TCT TCC CGG AAC CGT GAG TTC CCT GAA ATC TGG	845	
Ile Tyr Ser Ser Pro Asn Arg Glu Phe Pro Glu Ile Tyr		
GCA CCT GAC CGT CTG CCC CGG ATT GAA GAG CGG AGT CGT	884	
Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Glu Glu Glu Ser Glu		

TGG ACC ATT GAG ACC AAC ATT GAG CAG TAC TAC GCC GAT 923  
 Thr Ile Glu Thr Asn Ile Glu Glu Tyr Tyr Ala Asp  
 AAG AAC GGC ATT GTT GTG CTC CCA ATC GGT GGC GAG AGC 962  
 Lys Asn Ala Ile Val Val Leu Pro Ile Gly Glu Ser  
 TCC TTC TAC TCT GAC TGG GAA GAG CCA AAC AAC GGC AAG 1001  
 Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Glu Glu Pro Asn Asn Gly Lys  
 AAC TAC CGG GAG ACC TTC CTG ACT CAG GAG CTC GCA 1040  
 Asn Tyr Glu Trp Glu Thr Phe Leu Thr Glu Leu Ala  
 CCG ATC CTG GAC AAG GGC TTC CGT TCC AAC ACC GAT GGC 1079  
 Pro Ile Leu Asp Lys Gly Phe Arg Ser Asn Thr Asp Arg  
 GCC ATC ACC GGT ATC TCC ATG GGC GGT ACC GCT GGC GTT 1118  
 Ala Ile Thr Gly Ile Ser Met Gly Glu Thr Ala Ala Val  
 AAC ATC GCA ACC CAC CCA GAC ATG TTT AAG TTC GTC 1157  
 Asn Ile Ala Thr His His Pro Asp Met Phe Lys Phe Val  
 GGT TCC ITG TCC GGC TAT CTG GAC ACC ACC TCC GCT GGC 1196  
 Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Asp Thr Thr Ser Ala Gly  
 ATG CCA ATC GCT ATT TCC GCA GCC CTG GCA GAC GGC GGC 1235  
 Met Pro Ile Ala Ile Ser Ala Leu Ala Asp Ala Gly  
 GGA TAC GAT GCC AAC GCA ATG TGG GGA CCA GTC GGT TCT 1274  
 Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Met Trp Gly Pro Val Gly Ser  
 GAC CCC TGG CAG GAA AAC GAT CCA AAC AGC AAC GCA GAC 1313  
 Glu Arg Trp Glu Asn Asp Pro Lys Ser Asn Val Asp  
 AAG CTC AAC GGC AAG ACC ATC TAC GTC TCT GTC GGT AAC 1352  
 Lys Leu Lys Gly Lys Thr Ile Tyr Val Ser Ser Gly Asn  
 GGT GCA GAT GAC TTC GGT AAG GAA GAC GTC TCT GTC ATT 1391  
 Gly Ala Asp Asp Phe Gly Lys Glu Asp Ser Val Ala Ile  
 GGA CCT GCA AAC GCG ACA GGT GTC GGT CTG GAA GTC ATT 1430  
 Gly Pro Ala Asn Ala Thr Gly Val Leu Glu Val Ile  
 TCC CGT ATG ACT TCC CAG ACC TTC GTC GAT CGT GCA AAC 1469  
 Ser Arg Met Thr Ser Glu Thr Phe Val Asp Arg Ala Asn  
 CAG GCT GGC GTG GAA CCT GTT GCT ACC TTC CGT GCA TCC 1508  
 Glu Ala Val Glu Val Ala Ser Phe Arg Pro Ser  
 GGC GTG CAC TCA TGG GAA TAC TGG CAG TTC GAG ATG ACT 1547  
 Gly Val His Ser Trp Glu Tyr Trp Glu Phe Glu Met Thr

CAG GCG TTC CCT CAC ATC GCT AAC GCT CTT GCC ATG TCC 1586  
 Glu Ala Phe Pro His Ile Ala Asn Ala Leu Gly Met Ser  
 ACT GAG GAC CCT GGC GTT GAG TGT GCA CCT GTC GGC GCA 1625  
 The Glu Asp Arg Gly Val Glu Cys Ala Pro Val Gly Ala  
 ATC GCT GAC GCT GTC GGC GAC GGC GCG ATC GGC ACC TCC 1664  
 Ile Ala Asp Ala Val Ala Asp Gly Ala Met Gly The Cys  
 CTG ACC AAC GAA TAC GAT GTC ACC GGC GGT AAG GGC CAG 1703  
 Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Val Thr Gly Gly Lys Ala Glu  
 GAC TTG CCT AAC GGT CGC GCA TAG TGG TCT GCA AAC ACT 1742  
 Asp Phe Ala Asn Gly Arg Ala Tyr Trp Ser Ala Asn Thr  
 GGC GCT TTC GGC CTG GTT GGA CGC ATC AAC GCT CGT TAC 1781  
 Gly Ile Phe Gly Leu Val Gly Arg Ile Asn Ala Arg Tyr  
 TCT GAG CTG GGT GGA CCT GAC TCC TGG TTG GGC TAC CCA 1820  
 Ser Glu Leu Gly Phe Asp Ser Thr Leu Gly Tyr Pro  
 ACC TCT TCT GAG TTG AAG ACA CCA GAC GCA CGT GGC CCC 1859  
 Thr Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro Asp Gly Arg Gly Arg  
 TTC GTC ACC TTC GAG CAC GGC TCC ATC TAC TGG ACC GGC 1898  
 Phe Val Thr Phe Glu His Gly Ser Ile Tyr Trp Thr Ala  
 ACC ACT GGT CCT TGG GAA ATC CCA GGC GAT ATG CTC GCA 1937  
 Thr Ser Gly Pro Trp Glu Ile Pro Gly Asp Met Leu Ala  
 GCA TCG GGC ACC CAG GAC TAT GAG AAC GGC AGC CTC GGC 1976  
 Ala Trp Gly Thr Glu Asp Tyr Glu Lys Gly Ser Leu Gly  
 TAC CCA ACC GGC GCA GTT GAA TAC AAC GGT GGC CGC 2015  
 Tyr Pro Thr Gly Ala Ala Val Glu Thr Asn Gly Lys Leu  
 CGC CAG CAC TTC GAA GGT GGC TAC GCA TTC CGT ACC TCC 2054  
 Arg Glu Glu Phe Glu Gly Tyr Val Phe Arg Thr Ser  
 AAT AAC CAG TCT TAC TGG GTT CGC GCA GAA ATC TCC AAG 2093  
 Asn Asn Glu Ser Tyr Trp Val Arg Gly Glu Ile Ser Lys  
 AAG TAC CGC GAT GAC GCA ATC TTC GCT GAG CTT GGT TTC 2132  
 Lys Tyr Ala Asp Asp Gly Ile Phe Ala Glu Leu Gly Phe  
 CCA ACC GGC AAT GAG AAG TTG ATC AAC GGT GGC GCT TTC 2171  
 Pro Thr Gly Asn Glu Lys Leu Ile Asn Gly Glu Ala Phe  
 CAG GAA TTC GAA AAC GGC AAC TAC TGG TCC CGT TCC 2210  
 Glu Glu Phe Glu Lys Gly Asn Ile Tyr Trp Ser Val Ser

ACT GGC GCG CAC GTG ATT CTG CAC GGC GAC ATC TTC GAC 2249  
 Thr Gly Ala His Val Ile Leu His Gly Asp Ile Phe Asp  
 GCA TGG GGT GCT AAG GGC TGG GAG CAG GGC GAA TAC GGC 2288  
 Ala Trp Gly Ala Lys Gly Trp Glu Glu Gly Glu Tyr Gly  
 TTC CCA ACC TCT GAC CAG ACC GCA ATC ACC GCG GGT GGA 2327  
 Phe Pro Thr Ser Asp Glu Thr Ala Ile The Ala Gly Gly  
 CAG ACC ATT CAT TTC CAG AAC GGC ACC ATC CGT CAG GTC 2366  
 Glu Thr Ile Asp Phe Glu Asn Gly Thr Ile Arg Glu Val  
 AAT GGC CGA ATT GAG GAC TCT CGC TAATAGTGAA AGCCCCATCA 2409  
 Asn Gly Arg Ile Glu Glu Ser Arg  
 CGCAACTCTCGGTTCCGGACTTTTGCTGCTTGAGCTTGCTTGCGGGGGCA 2451  
 GTCAGCTGTTGAGGGAGATGATTCTCCCTCGACAGGGGGAGCCCCCAACAGAAA 2513  
 GCAGGGCTGGGTCAGCAGCACCCCAAGGTGGC 2547

配列番号：2

配列の型：スクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ：2702塩基対

鎖の数：5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ゲノムDNA

起源

生物名：コリネバクテリウム・メラッセコラ (*Corynebacterium selassescolum*)

株名：ATCC 17965

直接の実験源：クローン pCGL815、pCGL824

配列の特徴

S62-S67 AACGACリボソーム結合部位(S)

S79-2108 コード配列(S)

S79-883 分泌タンパク質シグナルペプチド(S)

2188-2333 ヘアピン構造転写ターミネーター-シグナル(S)

関連生物活性：コリネバクテリウム・メラッセコラ及び  
ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタムの壁の  
外層表面層を構成するタンパク質と細胞外抗原PS2  
の前駆体

GAATCCCTGGAATTAGCCGGTTTAGTACTTTCAAGGGGTGCTATTCAG 52  
 CAGATCTCACTTGCGGGTAGAGTCACCTGAAATAATTGCAACCGAACCG 104  
 GTGATATGCTATTCAGTACTGAGGTTAAGTGTATTTAGGTG 156  
 AACAAATTTCAGCTTCGGGAGAAGACTTTCTATGCCCTCAGAGCTCTAT 208  
 TAGGAAACTGACACCCTGATTAATAGCCYACCCCCGAAITGGGGATG 260  
 GGTCAITTTTGTGAGGTTAGTTTGATGCAATAGACCTGGCTTATAA 312  
 AGAAAATGAAACGTCAGATCGATATAAAAAGAACAGTTGACTCAGGT 364  
 TTGAGGCACTTCTCCGATTCGGCTGGCAAAATCTCAATTGCTTACAG 416  
 TTTTCTCACGACAGGCTGCTAAAGCTGCTAGTTCGGGGCTAGTCAGTCG 468  
 CGTTTACTTGGATATAAAAGTAAATCCCATGTCGATCAGGCATTTCGGGTG 520  
 TTCCATACGATCAAAAGTTGCTTGGATCACCTATTCAGGACCTTC 572  
 GCCTCT ATG TTT AAC AAC CGT ATC CGC ACT GCA GCT CTT 611  
 Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu  
 GCT GGT GCA ATC GCA ATC TCC ACC GCA GCT TCC CGC GTC 650  
 Ala Gly Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val  
 GCT ATC CCA TCC TTC GCT CAG CAG ACC CCA ACT TTC 689  
 Ala Ile Pro Ala Phe Ala Glu Ile Asp Thr Phe  
 AAC ATC ACC AAC GGC TTC AAC GAT GCT GAT GCA TCC ACC 728  
 Asn Ile Thr Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr  
 ATC CAG CCA GTT GGC CCT GTT AAC CAC ACC GAG GAA ACC 767  
 Ile Glu Pro Val Gly Val Asn His The Glu Glu Thr  
 CTC CGC GAC CTG ACT GAC TCC ACC GGC GCT TAC CTG GAA 806  
 Leu Arg Asp Leu Thr Asp Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Glu  
 GAG TTC CAG AAC GGC ACC GTT CAG GAA ATC GTC GAA GCA 845  
 Phe Asn Glu Asn Gly Thr Val Glu Glu The Val Glu Ala  
 TAC CTC CAG GTT CAG GCT TCC GCA GAC GCA TTC GAT CCT 884  
 Tyr Leu Glu Val Glu Ala Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro  
 TCT GAG CAG GCT GCT TAC GAG GCT TTC GAG GCT GCT GCG 923  
 Ser Glu Ala Ala Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg  
 GTC CGT GCA TCC CAG GAG CTC GCA GCT TCC GCT GAG ACC 962  
 Val Arg Ala Ser Glu Glu Leu Ala Ala Ser Ala Glu Thr

CAG CAC TAC TCT GGG CTG ATC CCT AAC CTC TTC ATC GCA 1625  
 Glu His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala  
 GCA GTT GCA AAC ATC AGC GAG CTC AAC GCT GCA GAT GCT 1664  
 Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala  
 GAA GCA GCA GCT TAC TAC CTC CAC TGG GAC ACC GAC CTC 1703  
 Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Leu His Trp Asp Thr Asp Leu  
 GCA ACC AAC TAC GAT GAG GAC GAA GCT TAC TAC AAC GCT AAG 1742  
 Ala Thr Asn Asp Gly Asp Ala Tyr Tyr Ala Lys  
 CTC GAC TTC GCT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC 1781  
 Leu Asp Phe Ala Ile Glu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe  
 AAC CGT GAA GTT TGG CAG CAG CCA CTG GCT TAC GTC CAG 1820  
 Asn Val Glu Val Glu Glu Pro Leu Ala Ile Tyr Val Glu  
 AAC CTG GAT GCA GGC GCA CGT CAG GAA GCA GCT GAG CCT 1859  
 Asn Leu Asp Ala Gly, Ala Arg Asn Glu Ala Ala Asp Arg  
 GAG GCA GCT CGC GCA GCT GAC GAA GCT TAC CGC GCT GAG 1898  
 Glu Ala Ala Arg Ala Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu  
 CAG CTC CGC ATC CCT CAG GAA GCA GCT GAC GAG CCT AAC 1937  
 Glu Leu Arg Ile Ala Glu Glu Ala Ala Asp Ala Glu Lys  
 GCT ATC GCT GAG GCG CTT GCT AAC GAA GCA GAA CGC AAC 1976  
 Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Gly Asn  
 AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACC GAG ACC GGT TCT TCT 2015  
 Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asn The Glu Thr Gly Ser Ser  
 GAC ATC GGA TCC TGG GCA CCT TTC GCA GCA ATT GCA GCT 2054  
 Asp Ile Gly Ser Trp Gly Pro Phe Ala Ala Ile Ala Ala  
 ATC ATC GCA GCA ATC GCA GCT ATC TTC GCA TTC CTC TCC 2093  
 Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ala Ile Phe Pro Phe Leu Ser  
 GGT ATC GTT AAC TTC TAA TTTCGAACCGAGATAGCTAAAGTTAAA 2139  
 Gly Ile Val Lys Phe

CCACCTCCCTTCTGGGGAGGTGGTTTCCCTTGGCTAACAGCACCAAA 2191  
 GAAAAGCCACCTCTTGTATCTCACAGGAGCTGGCTTACTTTATTACTGGG 2243  
 GAGCGGGAGGTGGCTGCTAACGCAAAATCTTGTCTTGTAGGGAGCT 2295

ATC ACC AAC ACC CGC GAG TCC GTT GCT TAC GCA CTC AAC 1001  
 Ile Thr Lys The Arg Glu Ser Val Ala Tyr Ala Leu Lys  
 GTT GAC CAG GAA GCT ACC GCT GCT TTC GAG GCA TAC CGC 1040  
 Val Asp Glu Glu Ala The Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Arg  
 AAC GCA CTT CGC GAT GCA GCT ATC TCT ATC AAC CCA GAT 1079  
 Asn Ala Leu Arg Asp Ala Ala Ile Ser Ile Asn Pro Asp  
 GGC TCT ATC AAC CCA GAT ACC TCT ATC AAC GCA CTG ATC 1118  
 Gly Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ser Ile Asn Leu Leu Ile  
 GAT GCT GCT AAC GCT GCT AAC CGC ACC GAT GCT GCA GAG 1157  
 Asp Ala Ala Asn Ala Ala Asn Arg Thr Asp Arg Ala Glu  
 ATC GAG GAT TAC GCT CAC CTT TAC ACC CAG ACC GAT ATT 1196  
 Ile Glu Asp Tyr Ala His Leu Tyr The Glu The Asp Ile  
 GCT CTT GAA ACT CCA CAG CTC GCA TAC GCT TTC GCA GAG 1235  
 Ala Leu Glu The Pro Glu Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Asp  
 CTG AAG GCT CTT CAG GCT GAG GTC GAC GCA GAC TCC GAG 1274  
 Leu Lys Ala Leu Glu Ala Val Asp Ala Asp Phe Glu  
 TGG TTG GGC GAG TTC GCA ATC GAC CAG GAA GAC GGT AAC 1313  
 Ile Phe Glu Phe Gly Ile Asp Glu Asp Gly Asn  
 TAC GTT CAG CGC TAC CAC CCT CCT GCT GTC GAG GCA CTC 1352  
 Tyr Val Glu Arg Tyr His Leu Pro Ala Val Glu Ala Leu  
 AAG GCT GAG GTC GAC GCT CGC GTC GCA GCA ATT GAG CCA 1391  
 Lys Ala Glu Val Asp Ala Arg Val Ala Ala Ile Glu Pro  
 CTT CGT GCA GAC TCC ATC GCT AAC CTC GAG GCG CAG 1430  
 Leu Arg Ala Asp Ser Ile Ala Lys Asn Leu Glu Ala Glu  
 AAG TCT GAC GTC CGT GTC CGC CAG CTC TTC GTC GAG CCT 1469  
 Lys Ser Asp Val Leu Val Arg Glu Leu Phe Leu Glu Arg  
 GCA ACC GCA CAG CGC GAC ACC CTC GTC GTC GAG GCG 1508  
 Ala The Ala Glu Arg Asp The Leu Arg Val Val Glu Ala  
 ATC TCT GCT ACC TCT GCT CGT TAC GTC GAA CTC TAC GAG 1547  
 Ile Phe Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Glu  
 AAC GTC GAG AAC GTT AAC GTC GAG AAC AAC ACC CTT CGC 1586  
 Asn Val Glu Asn Val Asn Val Glu Asn Lys Thr Leu Arg

GATAAICGGCTTAATGACIEGCCACTGGGGAGATTCCTCCGAAAGGCATCATGCA 2347  
 TTGTTCCAGCGGGTAAAGTGGCAAGGAGCTTCTGGATCGGGAATCTGGCTG 2399  
 GCCCCACAAATGACCCAGGGCGAGGGCATGAAATCTGAGGGACGGGCTGGCC 2451  
 TCAATGATGGCTGGAACTTCCAAACCACGGGACAGTGAAGGGCCACCTGCA 2503  
 AGGTAGCTTCTGGTGGCAAGGGCAGGGGGCCACGGAGACCCACGCTACCGCT 2555  
 GATGCCCAAGGAATCGGCTGCTTGGCTTGTCAACGGCCACGACCCAGTGT 2607  
 TCGAGAGGCAATTGCAACACCATCGCCGGTCAGTTCCTGATTITCTGGCAG 2659  
 GATECTCATCCCTSGATGCTGAGCTGGGTAGCTGGAGCTTCGGAGCTC 2702

## 特表平6-502548 (22)

配列番号 : 3

配列の型 : ネクレオチドと対応タンパク質

配列の長さ : 2160 基基対

鎖の数 : 5' - 3' 方向で一本鎖表示された二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ゲノム DNA

起源

生物名 : コリネバクテリウム・メラッセコラ (Corynebacterium melassecola)

株名 : ATCC 17965

直接の実験所 : クローン pCGL315, pCGL313, pCGL310

配列の特徴

因子ο60により認識され及びアンモニウムにより調節される 251-268 TCGTCATATCTGCCC プロモーター部位 (9)

437-442 TTCACA プロモーター・シグナル領域 -35 (S)

468-471 TAGCAT プロモーター・シグナル領域 -10 (S)

551-572 CGCAACGACCAAAATC リボソーム結合部位 (S)

573-1913 コード配列 (S)

1937-1977 ヘアピン構造の非保存性転写ターミネーター・シグナル (S)

関連生物活性 : 48300dポリペプチドとして変性グルで抑制する NADPH 依存性グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性

GCTACCTCGGGAGCTCTAGGAGATTGTGAAAGACGGTC	52
TGCAGCCCTATAAAAAGCTGTCACCTTGTGCTCAAGTGTG	104
CTAAGTTATATAACCGTCAGTCACCTGCTCAATTGCTGTGCTGAT	156
TTAATTAAAGAAGAGACTTCATGCAAGTTACCGCGTTTGGCGATACACAA	208
TTGATTAACCTAAAGAATTTCAAAACAAATTTCATTCCTTGCTGCTATC	260
TGTCGCCACTGCCATAATTGAACGTCAGCATTTACCGCTAAATGCCCGC	312
AGTCACTTAAGTCTAAAGCAGAGTTGCTTACGGCATCCGTAGTTA	364
AAACTTAAACCGTAGGTATGCAAGCCGGTTGATGTAACGCGTTTTA	415
AAAGTTTCAAGGATCAGATTTCACAGGCTTGTCCACCAAGCCCTAG	468
GATGTACATGGTGGCCCTCAATGGGAAACCACACATCACTAAATGGCCAGA	520
TACACACTTAAATCGTGGCCGATGCCAGCCAGATGGGAAACCGGAAATC	572
ATG ACA GTT GAT GAG CAG CTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG met the val asp glu cys val ser asn tyr tyr asp met	611
CTT CTG AAG CGG AAT GCT GGC GAG CCT GAA TTT CAC CAG leu leu lys arg asn ala gly glu pro glu phs his gln	650
GCA GTG GCA GAG GTT TTG GAA TCT TTG AAG ATC GTC CTG ala val ala glu val leu glu ser leu lys ile val leu	689
GAA AAG GAC CCT CAT TAC GCT GAT TAC GGT CTC ATC CAG glu lys asp pro his tyro ala asp tyr gly leu ile gln	728
CGC CTG TCG GAG CCT GAG CGT CAG CTC ATC TAC CGT GTG arg leu cys glu pro glu arg gln leu ile phe arg val	767
CCT TGG GTT GAT GAC CAG GGC CAG GTC CAC GTC AAC CCT pro trp val asp asp glu cys val his val asn arg	806
GGT TCC CCC GTG CAG TTC AAC TCT GCA CTT GCA CCA TAC gly phe arg val gln phs asn ser ala leu gly pro tyro	845
AAG GGC CGC CTG CGC TTC CAC CCA TCT GTC AAC CTG GGC lys gly gly leu arg phs his pro ser val asn leu gly	884
ATT GTG AAG TTC CTG GGC TTT CAG ATC TTT AAA AAC ile val lys gly phe glu glu ile phe phs asn	923
TCC CTA ACC GGC CTG CCA ATC GGT GGT GGC AAG GCT CGA ser leu thr gly leu pro ile gly gly lys gly	962

TCC GAC TTC GAC CCT AAG CCC AAG TCC GAT GTG GAA ATC 1001  
 ser asp phe asp pro lys gly lys ser asp leu glu ile  
 ATG CGT TTC TCC CAG TCC TTC ATG ACC GAG CTG CAC CGC 1040  
 met arg phe cys glu ser phs met thr glu leu his arg  
 CAC ATC GCT GAG TAC CGC GAC GTT CCT GCA GGT GAC ATC 1079  
 his ile gly gly tyr arg asp val pro ala gly asp ile  
 GGA GTT GGT CGC CGC GAG ATC CCT TAC CTG TTT CCC CAC 1118  
 gly val gly gly arg glu ile gly tyr leu phs gly his  
 TAC CGT CGC ATG CCC AAC CAG CAC GAC TAC CCC TTT TTG 1157  
 tyr arg arg met ala asn glu his glu ser gly val leu  
 ACC GGT AAG GGC CTG ACC TGG GGT GGA TCC CTG GTC CGC 1196  
 thre gly lys gly leu thr trp gly gly ser leu val arg  
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TCC GTC TAC TTC GTG AGT 1235  
 the glu ala thre gly tyr gly cys val tyr phs val ser  
 GAA ATG ATC AAG GCT AAG GGC GAG AGC ATC AGC GGC CAG 1274  
 glu met ile lys ala lys gly gly ser ile ser gly gln  
 AAG ATC ATC GTC TCC CGT TCC CGC AAC GTC GCA ACC TAC 1313  
 lys ile ile val ser gly ser gly asn val ala the tyr  
 GCG ATT GAA AAG GCT CAG GAA CTC CGC GCA ACC GTC ATT 1352  
 ala ile glu lys ala glu leu gly ala the val ile  
 GGT TTC TCC GAT TCC AGC GGT TGG GTT CAT ACC CCT AAT 1391  
 gly phe ser asp ser ser gly trp val his thr pro asn  
 GGC GTC GAC GTC GCT AAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTC 1430  
 gly val phe val ala lys leu arg glu ile lys glu val  
 CGC CGC GCA CGC GTC TCC GTG TAC CGC GAC GAA GTC GAA 1469  
 arg arg ala arg val ser val tyr ala asp glu val glu  
 GGC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGG TCC ATC TGG GAT CTC 1508  
 gly ala the tyr his thr asp gly ser ile trp asp leu  
 AAG TGC GAT ATC GCT CCT CCT TGT GCA ACT CAG AAC GAG 1547  
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala the gln asp glu  
 CTC AAC GGT GAG AAC GCT AAG ACT CTT GCA GAC AAC GGC 1586  
 leu asn gly glu asn ala lys thr leu ala asp asn gly  
 TGC CGT TTC GTC GCT GAA CGC CGC AAC ATG CCT TCC ACC 1623  
 cys arg phs val ala glu gly ala asn met pro ser thr

CGA GAG CCT GTT GAG GTC TTC CGT GAT GAG CAC ATC CCC 1664  
 pro glu ala val glu val phe arg glu arg asp ile arg  
 TCC GCA CCA CGC AAG GCA GCT AAC GCT GGT GGC GTT GCA 1703  
 phe gly pro glu ala asn ala asn ala gly gly val ala  
 ACC TCC GTC CGT GAG ACC CAG CAG AAC CCT TCG CGC GAT 1742  
 the ser ala leu glu met gln glu asn ala ser arg asp  
 TCC TGG ACC TTC CAG TAC ACC GAC GAG CCT CTC CAG GTC 1781  
 ser trp asp phe glu tyro the asp glu arg leu glu val  
 ATC ATG AAG ATC TCC AMG ACC CCT GCA GAG ACC GCA 1820  
 ile met lys asn ile phe lys the tyro, ala glu thr ala  
 GCA GAG TAT CGA CAC GAG AAC GAT TAC CCT GTC CGC CCT 1859  
 ala glu tyro his glu asn asp tyro val val gly ala  
 AAC ATT GCA CGC TTC AAG AAG GTC GCT GAC CGC ARG CGT 1898  
 asn ile ala gly phe lys val ala asp ala met leu  
 CGA CAG CGC GTC ATC TAA GACCCCTGCACTTACTTAAACCGCTGAA 1944  
 ala glu val ile OCN  
 TCCCGGTTAACGATTCAGGATTTCGTTCTGCTGGTCAATTATGCCATC 1996  
 CACATGGGTTAACGCTGCGGCGGCGGATATGATCACCGTGGTGTCT 2048  
 TTAAAGCTGGCCGAGCTCTGGGAAAGAACATCCGCTTGTGATGAGGCGCATCTGGT 2100  
 GGTGGTGGCTTCATCGACAAATCAACTTACGGGTTGGGTGCGGAGGAGG 2151  
 CGCCAGGAGAGCGGTTGGCTGGCTGGCGCTGAGAAGCC 2190

図面中の符号図 8 :

A - p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

図 9 :

A - p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

## 5' から 3' への配列の詳細

ACACCGCATTTGTTCCATCAAGGCTAAAGCTCAGGCCAACGGCGTTCCC  
 TCTGGATTGCAGCAGGGCGCTGTCCAACGGCAATTGGCTTGACTATGTCCC  
 TGCCACCATATGGCTTCGGCTCAGTCAGGAACCTTTCCTCTGATGCCGTAG  
 TTGGCACGACATCGGGCAGGGCTGACCGATGCCCTGACTGAGTACCTGAGAAG  
 CCTGGGGTCAAGGACACTGGCAGGGCAATTGCAATGCCAATGGCTGTGCG  
 ACCCGCGAACACACTGTGTGAGGGCAGGGTGCCATTACACAAAATAC  
 CCCATGGCTACTCTCATGCGGATAATCAGTCGGAGAGTACTGCAATG  
 CTCAAAGCAGAATGGGAAAGCTGGGAAGAGCAAGAGAAATTCTCGAACCGT  
 GCAGGGAGGATA

図 10 :

A - p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

## 5' から 3' への配列の詳細

CCTTTCCTCTGATGCCGTAGTGGCAGCATCCGGCAGGGCTCACCGATGG  
 CCTGACTGACTACCTGAAGGCTCGCTCGAAGACCTCGAGGCCAAATTCGAT  
 GGACACAGAAGGACACAGAACGGCACAGAAGGCACAGAACAGAACGGACA  
 GAAGGCACAGAACAGAACGGCACAGAACGGCACAGAACGGCAATGGCGG  
 CCTGTCGACCCCCGGCAACACTGTGTCAGGGCAGGGTGTG

図 11 :

A - p : csp1 のプロモーター  
 s : 検定 csp1 シグナル配列  
 m : 成熟 PS 1 の最初の 30 アミノ酸

CCTTTCCTCTGATGCCGTAGTGGCAGCATCCGGCAGGGCTCACCGATGG  
 CCTGACTGACTACCTGAAGGCTCGCTCGAAGACCTCGAGGCCAAATTCGAT  
 GGACACAGGCAACGGCTCAGGCCAGGCACAGGCCAGGGCAGGCCAGGC  
 CGCAGGCTCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGGCTCAGGCCA  
 GGCTCAAGGCTCAGGCCATGGCCGGCTGTGACCCGGCTGTGACCCGGCA  
 AACACTGTGTCAGGGCAGGGTGTG

図 12 :

ポリリンカー 1 : 0.001/SacII.BstXI.NotI.XbaI.  
 ポリリンカー 2 : 1.531/ClaI.SalI.AatI.XbaI.NcoI.  
 BglII.XbaI.StuI.PstI.SmaI.BamHI.SpeI.  
 ポリリンカー 3 : 1.561/BsaI.NotI.SacII.BstII.

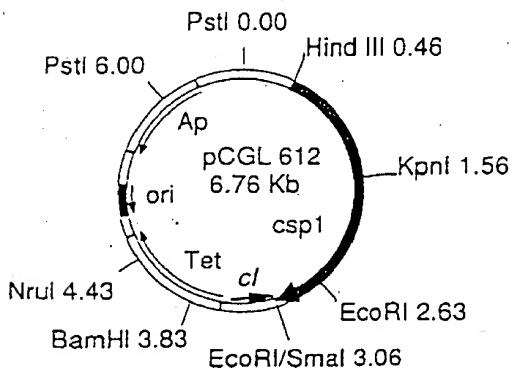


FIG. 1

AGCTTCAGGGAAAAACAGGCCCTAAAGTTATCCACAGATCCGAAGTG 52  
 ATCCGGCAGCTGGGTGAAAGTTATCCAGGAAAGGGAGGGCGGATTCA 104  
 XXXXXTCAGCGAAATCGCAALAGGTGGCGGAAAATCTGGGAGTCCTGGG 156  
 ATTCCCCGGCTGGCAATTCAALAGGTCTAAAGTGTGACTTAAATTGAGTC 208  
 ATTCTTAAGTTGTGACTCTGATCACACAGCTTACATACCCACATAGTAACC 260  
 TTCTGGACTAAAGTACCGACAGACTGCTAAAGACTGAGACTCTCAAGCAT 312  
 AGCCCCAGTGTGTTTGCGGGCGGAAACCGGGAAACTTTCGGACCGATCTA 364  
 ACTCATTCGGGGCTGTGGCACTATCCAAATTCAAAATTCAGAGGAAAC 416  
 TTC ATG CGC GAC ACC GCA TTT CGT TCC ATC AAC GCT AAA 455  
 Met Arg Asp Thr Ala Phe Arg Ser Ile Lys Ala Lys  
 GCT CAG GCT AAC CGC CGT TCC CTC TGG ATT GCA GCA GGC 494  
 Ala Glu Ala Lys Arg Arg Ser Leu Tyr Ile Ala Ala Glu  
 GCT GTC CCA ACC GCA ATT CGG TGG ACT ATG TCC CGT GCA 533  
 Ala Val Pro Thr Ala Ile Ala Leu Thr Met Ser Leu Ala  
 CCT ATG GCT TCC GCT CGA TCC AAG AAC CTT TCC TCT GAT 572  
 Pro Met Ala Ser Ser Asn Asn Leu Ser Ser Asp  
 GGC GTC GTT GGC ACC ATC CGG CAG GGC GTC ACC GAT GCG 611  
 Ala Val Val Gly Ser Ile Glu Val Thr Asp Gly  
 CTG ACT GAC TAC CGT AAC CCT CCC GTC GAA GAG CTT CCT 650  
 Leu Thr Asp Tyr Leu Lys Pro Arg Val Glu Glu Leu Pro  
 CCT GGT GAA GTC ACC TAC CGA CGG ATC GGC GGG CTG CCT 689  
 Ala Glu Glu Val Thr Pro Glu Ile Ala Glu Leu Pro  
 GAT GGT GTC GGC GTG ATC ACC GCT GCA GAG TCA GCA ACC TCC 728  
 Asp Gly Val Arg Val Ile Ser Ala Glu Thr Asp  
 AAG CAT GTC ATT TTG ACT ATT CGG TCT GCA GCA ATG CCA 767  
 Lys His Val Ile Leu Thr Ile Glu Ser Ala Ala Met Pro  
 GAG CGC CCA ATC AAG GTG CGA CGT CTC CTC CGG CGT GAC 806  
 Glu Arg Pro Ile Lys Val Glu Leu Leu Pro Arg Asp  
 TGG TAC TCT TCC CGG AAC CGT CGG TTC CCT GAA ATC TGG 845  
 Trp Tyr Ser Ser Pro Asn Arg Glu Phe Pro Glu Ile Trp  
 GCA CCT GAC GGT CTC CGC GCA ATT GAA GAG CAG AGT GGT 884  
 Ala Leu Asp Gly Leu Arg Ala Ile Glu Glu Glu Ser Gly

FIG. 2 (1ere planche)

TGG ACC ATT GAG ACC AAC ATT CAO CGG TAC TAC GCC GAT 923  
 Trp Thr Ile Glu Thr Asn Ile Glu Glu Tyr Tyr Ala Asp  
 AAC AAC GCC ATT GTG CTC CCA ATC GGT GGC GAG AGC 962  
 Lys Asn Ala Ile Val Val Leu Pro Ile Gly Glu Ser  
 TCC TTC TAC TCT GAC TCG GAA GAG CCA AAC AAC GGC AAG 1001  
 Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Glu Glu Pro Asn Asn Gly Lys  
 AAC TAC CAG TCC GAG ACC TTC CTG ACT CAG GAG CTC GCA 1040  
 Asn Tyr Glu Trp Glu Thr Phe Leu Thr Glu Glu Leu Ala  
 CGG ATC CTG GAC AAC GGC TTC CGT TCC AAC ACC GAT CGC 1079  
 Pro Phe Leu Asp Ile Gly Phe Arg Ser Asn Thr Asp Arg  
 GCC ATC ACC GGT ATC TCC ATG GGC GGT ACC GCT GCG GTT 1118  
 Ala Ile Thr Gly Ile Ser Met Gly Gly Thr Ala Ala Val  
 AAC ATC GCA ACC CAC CAC CCA GAC ATG TTT AAG TTC GTC 1157  
 Asn Ile Ala Ala His Pro Asp Phe Lys Phe Val  
 GGT TCC TCC GGC TAT CTG GAC ACC ACE TCC GCT GGC 1196  
 Gly Ser Phe Ser Gly Tyr Leu Asp Thr Ser Ala Gly  
 ATG CCA ATC GCT ATT TCC GCA GCC CTC GCA GAC GGC GCG 1235  
 Met Pro Ile Ala Ile Ala Ala Leu Ala Asp Ala Gly  
 GGA TAC GAT GGC AAC GCA ATG TGG CGA CCA GTC GGT TCT 1274  
 Gly Tyr Asp Ala Asn Ala Met Phe Trp Gly Pro Val Gly Ser  
 GAG CGC TCG CAG GAA AAC GAT CCA AAC ACC AAC GTA GAC 1313  
 Glu Arg Trp Glu Asn Asp Pro Lys Ser Asn Val Asp  
 AAC CTC AAC GGC ARG ACC ATC TAC GGT TCC TCT GGT AAC 1352  
 Lys Leu Lys Gly Thr Ile Tyr Val Ser Ser Gly Asn  
 CGT GCA GAT GAC TTC GGT AAG GAA GAC TCT GTC GCT ATT 1391  
 Gly Ala Asp Asp Phe Gly Lys Glu Asp Ser Val Ala Ile  
 GGA CCT GCA AAC GCG ACA GGT GTC GGT CTG GAA GTT ATC 1430  
 Gly Pro Ala Asn Ala Thr Gly Val Glu Val Val Ile  
 TCC CGT ATG ACT TCC CAG ACC TTC GTC GAT CGT GCA AAC 1469  
 Ser Arg Met Thr Ser Glu Thr Phe Val Asp Arg Ala Asn  
 CAG CCT CGC GTC GAA GTT GTT GCT ACC TTC CGT CCA TCC 1508  
 Glu Ala Gly Val Glu Val Val Ala Phe Arg Pro Ser  
 GGC GTG CAC TCA TGG GAA TAC TGG CGM TTC GAG ATG ACT 1547  
 Gly Val His Ser Trp Glu Tyr Trp Glu Glu Met Thr

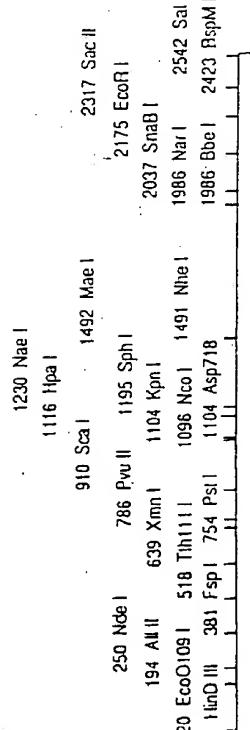
FIG.2 (2eme planche)

CAG CGG TTC CCT GAC ATC GCT AAC GCT CTC GGC ATG TCC 1586  
 Glu Ala Phe Pro His Ile Ala Asn Ala Leu Gly Met Ser  
 ACT GAG GAC GGT GGC GTT GAG TCT GCA CCT GTC GGC GCA 1623  
 Thr Glu Asp Arg Gly Val Glu Cys Ala Pro Val Gly Ala  
 ATC GCT GAC GCT GTT GGC GAC GGC GCG ATG GGC ACC TCC 1664  
 Ile Ala Asp Ala Val Ala Asp Gly Ala Met Gly Thr Cys  
 CTG ACC AAC GAA TAC GAT GTI ACC GGC GGT AAG GGC CAG 1703  
 Leu Thr Asn Glu Tyr Asp Val Thr Gly Gly Lys Ala Glu  
 GAC TTC GCT AAC GGT CGG GCA TAC TGG TCT GCA AAC ACT 1742  
 Asp Phe Ala Asp Ala Val Ala Asp Gly Lys Asn Thr  
 GCC GCT TTC GGC CTC GGT GGA CCT GAC TCC TGG TCT GGC TAC CCA 1781  
 Gly Ala Phe Gly Leu Val Gly Arg Ile Asn Ala Arg Tyr  
 TCT GAG CTC GGT GGA CCT GAC TCC TGG TCT GGC TAC CCA 1820  
 Ser Glu Leu Gly Gly Asp Ser Trp Leu Gly Tyr Pro  
 ACC TCT TCT GAC TGG AAG ACA CCA GAC GCA CGT GGC CGC 1859  
 Thr Ser Ser Glu Leu Lys Thr Pro Asp Gly Arg Gly Arg  
 TTC GTC ACC TTC GAG CAC GGC TCC ATC TAC TGA ACC GGC 1898  
 Phe Val Thr Phe Glu His Gly Ser Ile Tyr Trp Thr Ala  
 ACC ACT GGT CCT TGG GAA ATC CCA GGC GAT ATC CTC GGC 1937  
 Thr Thr Gly Pro Trp Glu Ile Pro Gly Asp Met Leu Ala  
 CGA TGG CGC ACC CAG GAC TAT GAG CGC 'LOC CTC GGC 1976  
 Ala Trp Gly Thr Glu Asp Tyr Glu Lys Gly Ser Leu Gly  
 TAC CCA ACC GGC GGC GCA GTT GAA TAC AAC GGT GGC CTC 2015  
 Tyr Pro Thr Gly Ala Ala Val Glu Tyr Asn Gly Gly Leu  
 CGC CCA CAG TTC GAA GGT GGC TAC GTC TCC CGT ACC TCC 2054  
 Arg Glu Glu Phe Glu Gly Tyr Val Phe Arg Thr Ser  
 AAT AAC CAG TCT TAC TGG GTT CGC GGA GAA ATC TCC AAG 2093  
 Asn Asn Glu Ser Tyr Trp Val Arg Gly Glu Ile Ser Lys  
 AAG TAC GGC GAT GAC GGA ATC TTC GCT CGG CTC GGT TCC 2132  
 Lys Tyr Ala Asp Asp Gly Ile Phe Ala Glu Leu Gly Phe  
 CCA ACC GGC AAT GAG AAC TGG ATC ATC AAC GGT CGT TCC 2171  
 Pro Thr Gly Asn Glu Leu Ile Asn Gly Gly Ala Phe  
 CAG GAA TTC GAA AAC GGC AAC ATC TAC TGG TCT CTC TCC 2210  
 Glu Glu Phe Glu Lys Gly Asn Ile Tyr Trp Ser Val Ser

FIG.2 (3eme planche)

ACT GGC GCG CAC GTG ATT CTG CAC GGC GAC ATC TTC GAC 2249  
 Thr Gly Ala His Val Ile Leu His Gly Asp Ile Phe Asp  
 GCA TGG GGT GCT AAG GGC TGG CAG CGC GAA TAC TCC 2288  
 Ala Trp Gly Ala Lys Gly Trp Glu Glu Gly Gly Tyr Gly  
 TTC CCA ACC TCT GAC CAG ACC GCA ATC ACC GCG GGT GCA 2327  
 Phe Pro Thr Ser Asp Glu Thr Ala Ile Thr Ala Gly Gly  
 CAG ACC ATT CAT TTC CAG AAC GGC ACC ATC CGT CAG GTC 2366  
 Glu Thr Ile Asp Phe Glu Asn Gly Thr Ile Arg Glu Val  
 AAT GGC GCA ATT GAG GAG TCT CCC TAATAGTGAA ACCCCATCTA 2409  
 Asn Gly Arg Ile Glu Glu Ser Arg  
 CGCCAACTCTCGCTTCCGGACTTCTTGTGCCCTGACCCCTGCTGTCGGGGAA 2461  
 GTCACTGTTGAAAGGAGATGATTCTCCCTCGACAGGCGCGACAGAAA 2513  
 CGCCCGCTGGTCAGCACCAACCGCGAGGTGCG

FIG.2 (4eme planche)



CSP1 (HSAl)

FIG. 3

17

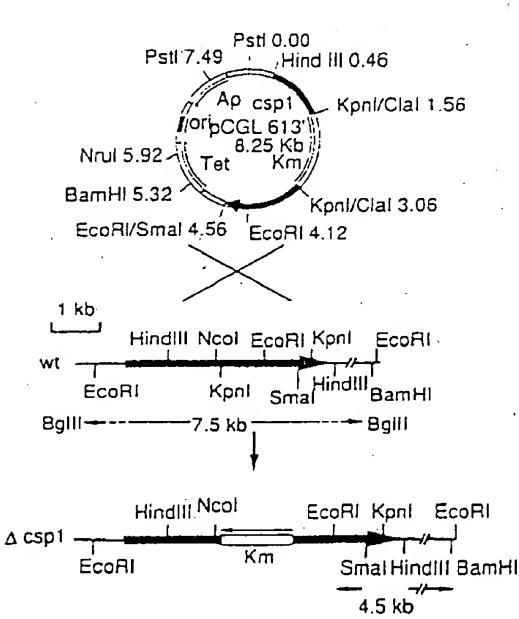


FIG. 5

-25-

Fig. 6

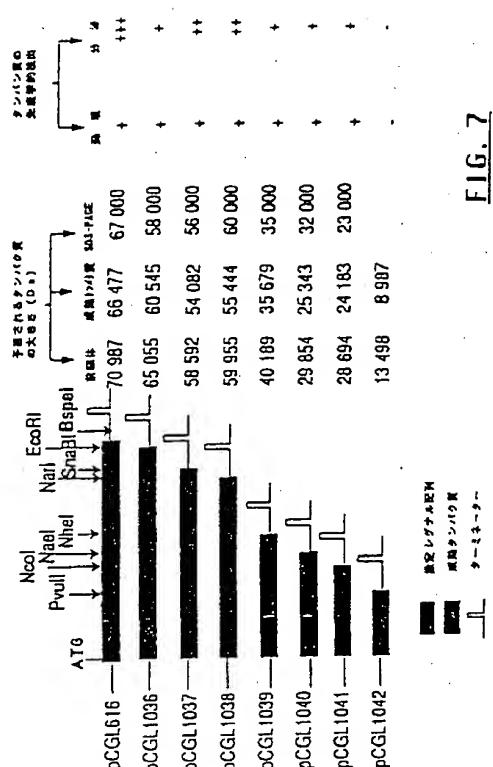


Fig. 7

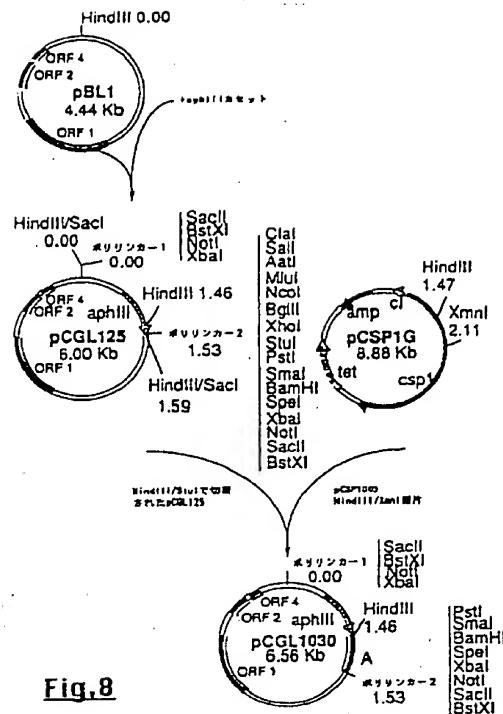


Fig. 8

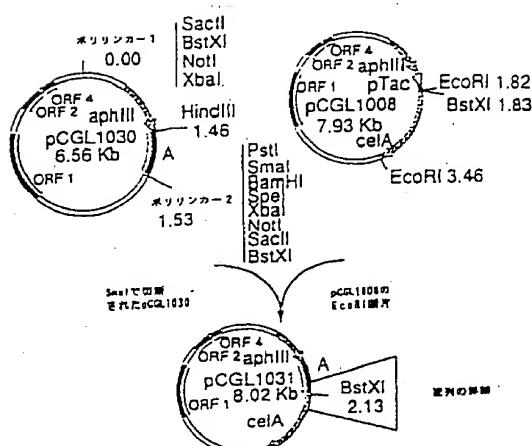


Fig. 9

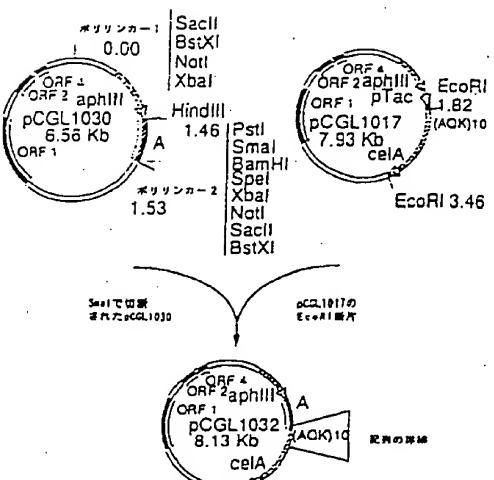


Fig. 10

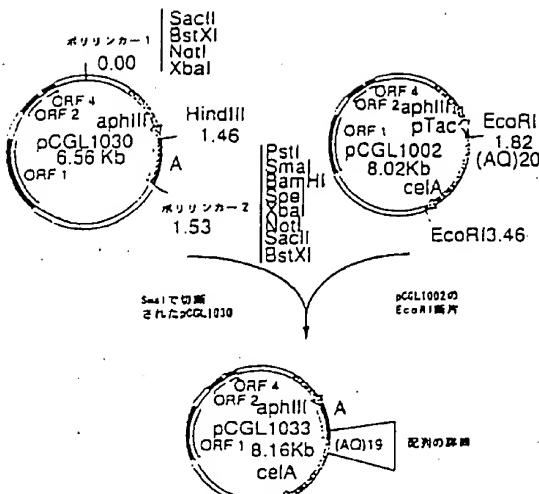


FIG. 11

ATC ACC AAC CGC GAG TCC GTT GCT TAC GCA CTC AAG 1001  
 Ile Thr Lys Thr Arg Glu Ser Val Ala Tyr Ala Leu Lys  
  
 GTT GAC CAG GAA CCT ACC CCT GCT TTC CAG GCA TAC CCC 1040  
 Val Asp Glu Ala Thr Ala Ala Phe Glu Ala Ala Tyr Arg  
  
 AAC GCA CTT CGC GAT GCA CCT ATC TCT ATC AAC CCA GAT 1079  
 Asn Ala Leu Asp Asp Ala Ala Ile Ser Ile Asn Pro Asp  
  
 CGC TCT ATC AAC CCA GAT ACC TCT ATC AAC CTA CTG ATC 1118  
 Gly Ser Ile Asn Pro Asp Thr Ile Asn Leu Leu Ile  
  
 CAT CCT GCT AAC CCT AAC GCG ACC ACC GAT CCT GCA GAG 1157  
 Asp Ala Ala Asn Ala Asn Arg Thr Asp Arg Ala Glu  
  
 ATC GAG CAT TAC CCT TAC ACC CAG ACC GAT ATT 1196  
 Ile Glu Asp Tyr Ala His Leu Tyr Thr Glu Thr Asp Ile  
  
 GCT CTT GAA ACT CCA CAG CTT GCA TAC CCT TTC CAG GAC 1235  
 Ala Leu Glu Thr Pro Glu Leu Ala Tyr Ala Phe Glu Asp  
  
 CTG AAC CCT CTT CAG CCT GAG GTC GAC GCA GAG TTC CAG 1274  
 Leu Lys Ala Leu Ala Glu Val Asp Ala Asp Phe Glu  
  
 TGG TTG GGC GAG TTC GGA ATC GAC CAG GAA GAC GGT AAC 1313  
 Tyr Leu Glu Phe Glu Ile Asp Glu Glu Asp Glu Asn  
  
 TAC CCT CAG CCC TAC CTC CCT CCT GCT GTC GAG GCA CTC 1352  
 Tyr Val Glu Arg Tyr His Leu Pro Ala Val Glu Ala Leu  
  
 AAG CCT GAG GTC GAC GCT CGC GTC GCA GCA ATT GAG CCA 1391  
 Lys Ala Glu Val Asp Ala Arg Val Ala Ile Glu Pro  
  
 CCT CGT GCA GAC TCC ATC CCT AAC CCT GAG GCG CAG 1430  
 Leu Arg Ala Asp Ser Ile Ala Lys Asn Leu Glu Ala Glu  
  
 AAG TCT GAC GTT CTG GTT CGC CAG CTC TTC CTC GAG CGT 1469  
 Lys Ser Asp Val Leu Val Arg Glu Leu Phe Leu Glu Arg  
  
 GCA ACC GCA CAG CGC GAC ACC CTC CCT GTT GTC GAG GCG 1508  
 Ala Thr Ala Glu Arg Asp Thr Leu Arg Val Glu Ala  
  
 ATC TTC TCT ACC TCT CCT CGT TAC CCT GAA CTC TAC GAG 1547  
 Ile Phe Ser Thr Ser Ala Arg Tyr Val Glu Leu Tyr Glu  
  
 AAC GTC GAG AAC GTT AAC GTT GAG AAC AAG ACC CTT CGC 1586  
 Asn Val Glu Asn Val Asn Val Glu Asn Lys Thr Leu Arg

FIG. 12 (2eme planche)

GAATTCCGTGAAATACCGCGGTTAGTACTTTTCAGGGGTCTTATCTTAC 52  
 CAGATCGTCAGTTGGGTAGCTAGTCACCTGAAATAATTGCAACCCACGG 104  
 GTGATATTCCTTAATTGCTCAAGTAGCTTCGAGGTAAAGTGTTTTAGGT 156  
 AACAAATTTCAGCTTGGGTAGAAGACTTTCTATGCCCTTCAGACCTCTAT 208  
 TAGGAAATCTGACACCACCTTGAATTAAATAGCTTACCCCGAATTGGGGATG 260  
 GGTCAATTGCTGAGGTACTTTCTGATCATAATGACCTGGCTTATAA 312  
 AGAAATGTTAACGTYCATGACAGATCGATAATAAGAACACTTGTACTCAGT 364  
 TTGAAAGCTTCTCCGATTGCGCTGGCAGAAAATCTCAATTGCGCTACAG 416  
 TTTCTCACCGACAGCGCTGCTAGCTGCTAGTTGGTGGCTTAGTGACTGG 468  
 CGTTTACTGGTATAAAGGTAATCCCATGTCGATCAGCCATTGGGTTCT 520  
 TCCATAGGATCTTAAAGGTTCTGCTTTCGATACCTTCAAGGAGCCTTC 572  
 GCCTCT ATG TTT AAC AAC CGT ATC CCC ACT GCA CCT CTT 611  
 Met Phe Asn Asn Arg Ile Arg Thr Ala Ala Leu  
  
 GCT GCT GCA ATC OCA ATC TCC AAC GCA GCT TCC CCC GTC 650  
 Ala Ala Ile Ala Ile Ser Thr Ala Ala Ser Gly Val  
  
 GCT ATC CCA GCA TTC OCT CAG CAG ACC AAC CCA ACT TTC 689  
 Ala Ile Pro Ala Phe Ala Glu Glu Thr Asn Pro Thr Phe  
  
 AAC ATC ACC AAC GGC TTC AAC GAT GCT GAT GGA TCC ACC 728  
 Asn Asn The Asn Gly Phe Asn Asp Ala Asp Gly Ser Thr  
  
 ATC CGC CCT CCT GGC CCT GTT AAC CAC ACC CAG GAA ACC 767  
 Ile Glu Pro Val Glu Pro Val Asp His Thr Glu Glu Thr  
  
 CTC CGC GAC CCT ACT GAG TCC ACC GGC CCT TAC CGC GAA 806  
 Leu Arg Asp Leu Thr Asp Ser Thr Gly Ala Tyr Leu Glu  
  
 GAG TTC CAG AAC CGC ACC CCT GAG GAA ATC CCT GAA GCA 845  
 Glu Phe Glu Ala Asn Gly Thr Val Glu Glu Ile Val Glu Ala  
  
 TAC CGC CCT CAG CCT TCC GCA GAC GCA TCC CAT CCT 884  
 Tyr Leu Glu Val Glu Ala Ser Ala Asp Gly Phe Asp Pro  
  
 TCT CGC GAG CCT CCT TAC GAG CCT TTC GAG CCT CCT CGC 923  
 Ser Glu Glu Ala Ala Tyr Glu Ala Phe Glu Ala Ala Arg  
  
 GTC CCT GCA TCC CAG GAG CCT GCA CCT CCT CCT GAG ACC 962  
 Val Arg Ala Ser Glu Glu Leu Ala Ala Ser Ala Glu Thr

FIG. 12 (3eme planche)

CAG CAC TAC TCT CGC CTC ATC CCT AAC CTC TTC ATC GCA 1625  
 Glu His Tyr Ser Ala Leu Ile Pro Asn Leu Phe Ile Ala  
  
 GCA GTT GCA AAC ATC ACC GAG CTC AAC CCT GCA GAT CCT 1664  
 Ala Val Ala Asn Ile Ser Glu Leu Asn Ala Ala Asp Ala  
  
 GCA GCA GCA CCT TAC TAC CTC CAC TGG GAC ACC GAC CTC 1703  
 Glu Ala Ala Tyr Tyr Leu His Trp Asp Thr Asp Leu  
  
 GCA ACC AAC GAT GAG GAC GAA CCT TAC TAC AAC CCT AAC 1742  
 Ala Thr Asn Asp Glu Asp Glu Ala Tyr Tyr Lys Ala Lys  
  
 CTC GAC TTC GCT ATC GAG ACC TAC GCA AAG ATC CTG TTC 1781  
 Leu Asp Phe Ala Ile Glu Thr Tyr Ala Lys Ile Leu Phe  
  
 AAC CCT GAA CCT TGG CAG CGC GCA CCT CCT CCT TAC CTC CAC 1820  
 Asn Glu Glu Val Trp Glu Glu Pro Leu Ala Tyr Val Glu  
  
 AAC CTG GAA GCA GGC GCA CCT CAG GAA CCT GAC CCT 1859  
 Asn Leu Asp Ala Gly Ala Arg Glu Ala Ala Asp Arg  
  
 GAG GCA CCT CCT GCA CCT GAC GAA CCT TAC CCC CCT CGC 1898  
 Glu Ala Ala Arg Ala Asp Glu Ala Tyr Arg Ala Glu  
  
 CAG CTC CGC ATC GCT CAG GAA GCA CCT GAC CCT CAG AAC 1937  
 Glu Leu Arg Ile Ala Glu Glu Ala Ala Asp Ala Glu Lys  
  
 GCT ATC CCT GAG GCG CCT CCT GCT AAC GAA GCA GAA GGC GAG 1976  
 Ala Ile Ala Glu Ala Leu Ala Lys Glu Ala Glu Glu Asn  
  
 AAC GAC AAC TCC TCC GAC AAC ACC GAG ACC CCT TCT TCT 2015  
 Asn Asp Asn Ser Ser Asp Asn Thr Glu Thr Gly Ser Ser  
  
 GAC ATC GCA TCC TGG GCA CCT TTC GCA GCA ATT GCA CCT 2054  
 Asp Ile Glu Ser Trp Glu Pro Phe Ala Ala Ile Ala Ala  
  
 ATC ATC GCA ATC GCA GCT ATC TTC GCA TTC CTC TCC 2093  
 Ile Ile Ala Ala Ile Ala Ile Ile Phe Pro Phe Leu Ser  
  
 GGT ATC GTT AAC TTC TAA TTTCGAAACGGAGATAGCTAAAGTTAAA 2139  
 Glu Ile Val Lys Phe  
  
 CCACCTCTTCTCTGGGGAGGTGGTTTCCCTGGCTAACAGCACCACCA 2191  
  
 GAAAAAGCACCCTCTTGTAGCTCAGGAGGTGGCTTATCTTTTACTGGG 2243  
 GACCCGGAGGTGGCTCGATTAAGCAAAATCTTTGCTTAAAGGAAACGT 2295

FIG. 12 (3eme planche)

```

GATAATCGGCTTAATGACTCGCACCTGGGGAATCCGCAGAACGGCATCTTGA 2347
TTGTTCACGGGGTAGTGCGCAGAGCTCTCGCTCGGAATTCTGCCCTG 2399
GGCCCACAAAATGACCCAGGGGAGGGATGAAATCTGAGGGACGGCGCTCCCC 2451
TCAATGATGGTCTGGAACTTCCACACCGGACCACTGACGCGCCAACTCTGGA 2503
AGGTAGCTTCCGTGGAGGGCAGGGGAGGGGGCGGAGGAGACCCACGGTACCGTT 2555
GATGGCCARAGGAATGCGCTGCTTGCCTGGTACGGGACAGGACACCAGTGTGA 2607
TGGAGACCCGAAATTCACACCATCCCGGGTCACTTCTGTAATTCTCCGGAC 2659
GATCTCTATCTTGGAGTTGATCTGTTGGGTAACCTCCGGAECTC 2702

```

FIG. 12 (4eme planche)

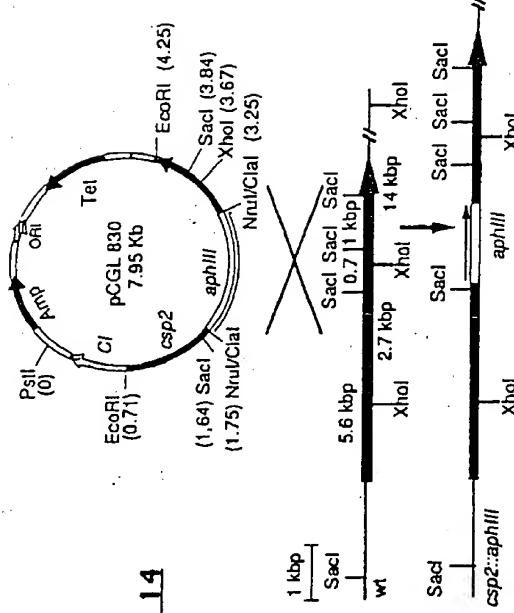
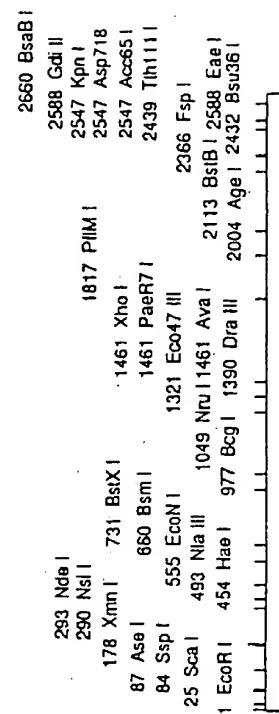


Fig. 14



**Fig. 13**

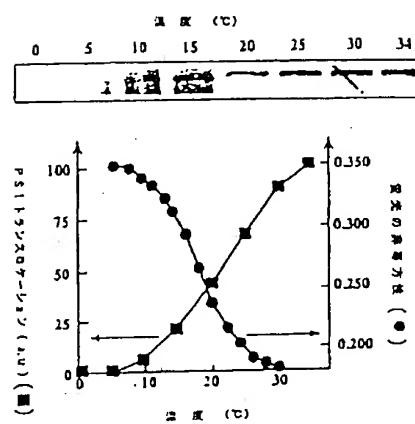


FIG. 15

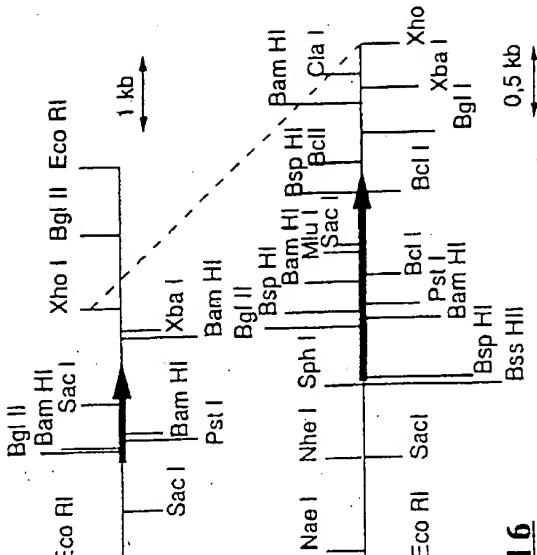


FIG. 16

GCTAGCCCTGGGAGCTCTAGGAGATTGTGAAAAACGGGTCAAAATTCCTCGA 52  
 TGCACCCCTATAAAAAGTGTGACCAATTCCATTCAGGAGGGTGTGAAAGTGTG 104  
 CCAGGTATAATAACCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC 156  
 TTAAATTAAAGAAAGACAGACTTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTCAGTC 208  
 TTGATTAACCTAAAGAAATTTCAGAACAAATTAAATCTTTGGGGATACACAA 260  
 TGTCGCAACACTGGCATTAATGAGACGTGAGGCAATTACCGCCCTAAATGCCCGC 312  
 AGTGAGTTTAAAGTCGAAGAGAAAGTTGCTCTTAAAGGCAATCCGTAGTTA 364  
 AAACATTAAACCGTTAGGTATACACAGGCCGGTTGATGTAACAGCTTAA 416  
 AAAGTTTACGGATCAGATTTCACAGGCAATTTCCTCCAGCAACGCCTAG 468  
 GATGTACAATGGCCCTCAATGGGACCCACACATCACTAAATGGCCCAAGA 520  
 TACACACTTTAAATCGTGGCCCATGCACGCCACATGGCAACTGGAAATTC 572  
 ATG ACA GTT GAA GAG CAG CTC TCT AAC TAT TAC GAC ATG 611  
 met arg val arg glu glu val ser ser tyr tyr asp met  
 CTT CTG AAG CGC AAT CCT GCG CAG CCT GAA TTT CAC CAG 650  
 leu leu lys arg asp ala gly glu pro glu phe his glu  
 GCA CTG GCA GAG CCT TTG CAA TCT TCG AAC ATC CTC CTG 689  
 ala val ala glu val leu glu ser leu lys, ile val leu  
 GAA AAG GAC CCT CAA TAC CCT GAT TAC CCT GGT CTC ATC CAG 728  
 arg leu cys glu pro glu arg gly leu ile phe arg val  
 CCT TGG CCT CAT GAC CAG CGC CAG GTC CAC GTC AAC CCT 804  
 pro trp val asp asp glu val his val asn arg  
 CCT TCC CGC GTC CAG TTC AAC TCT CCA CTT GCA CCA TAC 845  
 gly phe arg val glu phe asn ala leu gly pro tyr  
 AAG GCG GGC CTG CSC TTC CAC CCA TCT GTA AAC CTG GGC 884  
 lys gly leu arg phe his pro ser val asn leu gly  
 ATT CTG AAG TTC CTG CGC TTT GAG CAG ATC TTT AAA AAC 923  
 ile val lys leu glu phe glu glu ile phe lys asn  
 TCC CTA ACC GCG CTC CCA ATC CCT GGT GGT GGC AAG CCT GCA 962  
 ser leu thr gly leu pro ile gly gly gly lys gly gly

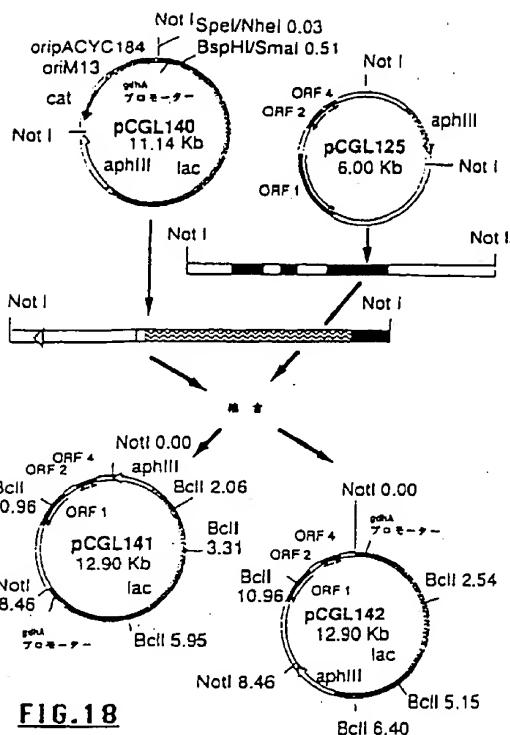
FIG. 17 (1ere planche)

TCC GAC TTC GAC CCT AAG CCC AAG TCC GAT CTC GAA ATC 1001  
 ser asp phe asp pro lys ser asp leu glu ile  
 ATG CCG TTC TGC CAG TCC TTC ATG ACC GAG CTC CAC CCC 1040  
 met arg phe cys glu ser phe met thr glu leu his arg  
 CAC ATC GGT GAG TAC CGC GAC CCT CCT GCA GGT GAC ATC 1079  
 his ile gly glu tyr arg asp val pro ala gly asp ile  
 GGA GTT CGT GCG CGC CGC ACT CCT GTC TTT GGC CAC 1118  
 gly val gly gly arg glu ile gly tyr leu phe gly his  
 TAC CCT CGC ATG CCC AAC CAG CAC GAG TCC GGC GTT TTG 1157  
 tyr arg arg met ala asn glu his glu ser gly val leu  
 ACC GGT AAG CGC CTC TGG GGT GCA TCC CTC GTC CGC CCG 1196  
 thr gly lys gly leu thr trp gly gly ser leu val arg  
 ACC GAG GCA ACT GGC TAC GGC TCC GTT TAC TTC-GTC ATG 1235  
 the glu ala thr gly gly val tyr phe val ser  
 GAA ATG ATC AAG GCT AAG GCG GAG AGC ATC ACC GGC CAG 1274  
 glu met ile lys ala lys gly glu ser ile ser gly glu  
 AAG ATC ATC GTT TCC GGT TCC GGC AAC GCA ACC TAC 1313  
 lys ile ile val ser gly ser gly ser val ala the tyr  
 GCG ATT GAA AAG CCT CGG GAA CTC CGC GCA ACC GTT ATT 1352  
 Ala ile glu lys ala glu glu leu gly ala the val ile  
 CCT TCC TCC GAT TCC ACC GGT TCC GTC CAR ACC CCT ATT 1391  
 gly phe ser asp ser ser gly trp val his the pro met  
 GCG GTT GAC GTG CCT AAG CTC CGC GAA ATC AAG GAA GTT 1430  
 gly val asp val ala lys leu arg glu ile lys glu val  
 CCC CCC GCA CGC GTC TCC GTG TAC CGC GAC GAA GTT GAA 1469  
 arg arg ala arg val ser val tyr ala asp glu val glu  
 GGC GCA ACC TAC CAC ACC GAC GGG TCC ATC TGG GAT CTC 1508  
 gly ala the tyr his the asp gly ser ile trp asp leu  
 AAG TGC GAT ATC CCT CTT CCT TGT GCA ATC GAG AAC GAG 1547  
 lys cys asp ile ala leu pro cys ala the glu asn glu  
 CTC AAC GGT GAG AAC CCT AAG ACT CCT GCA GAC AAC GGC 1586  
 leu asn gly glu asn ala lys the leu ala asp asn gly  
 CCT CGT TTC GTT CCT GAA GGC AAC ATG CCT TCC ACC TCC ACC 1625  
 cys arg phe val ala glu gly ala asn met pro ser thr

FIG. 17 (2eme planche)

CCA GAG GCT GTT GAG GTC TTC CGT GAG CGG GAC ATC CGC 1664  
 pro glu ala val glu val phe arg glu arg asp ile arg  
 TTC CGA CCA CGC AAG GCA CCT AAC CCT GGTC CGC CCT GCA 1703  
 phe gly pro gly lys ala ala asn ala gly val ala  
 ACC TCC CCT CTG GAG ATG CAG CAG AAC CCT TCG CGC GAT 1742  
 thr ser ala leu glu met glu glu asn ala ser arg asp  
 TCC TGG AGC TTC GAG TAC ACC GAC GAG CGC CTC CAG GTG 1781  
 ser trp ser phe glu tyr thr asp glu arg leu glu val  
 ATC ATG AAG AAC ATC TTC AAG ACC TGT GCA GAG ACC GCA 1820  
 ile met lys asn ile phe lys the cys ala glu the ala  
 GCA GAG TAT GGA CAC GAG AAC GAT TAC GTT GTC CGC CCT 1859  
 ala glu tyr gly his glu asn asp tyr val val gly ala  
 AAC ATT CCT CGC TTC AAG AAG GTA CCT GAC CGG ATG CTG 1898  
 asn ile ala ala gly phe lys lys val ala asp ala met leu  
 GCA CAG GGC GTC ATC TAA GACCCCTGACTTIACTTAAACCCCTGA 1944  
 ala glu gly val ile OCH  
 TCCGGCTTAAGGATCAGGGATTTCGATTTCTCCAGGTAAATTATCCGAGC 1996  
 CACATGGCTTAATGCAGCTGTGGGGTGGCCAAATGATCATCACCGTGTGTC 2048  
 TTAAAGCGTGGCTCAAGACTGTGGGAAAGATCCGGTTCATGACGGCATCTGGT 2100  
 GGCTGGTGGCTCATGACALATCAGTACCTGACGGGTGGCTGCCAAGGAGC 2152  
 CGCCAGGCAGAGCCGTGTTGCTGTCGCCAGATAGOC 2190

FIG. 17 (3eme planche)

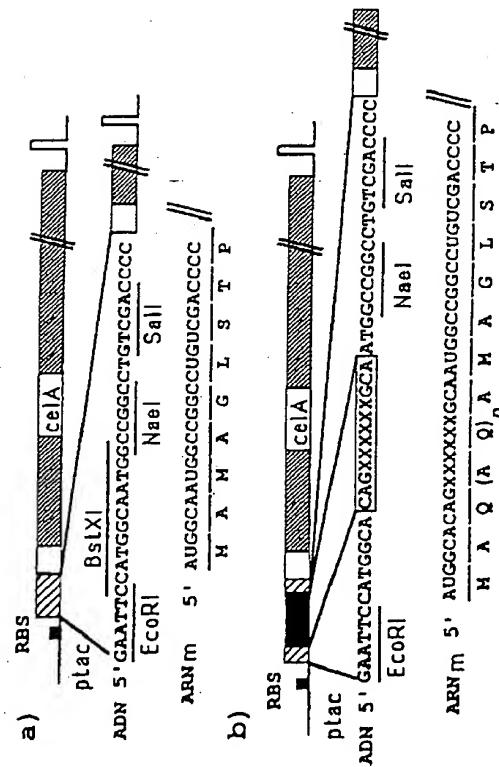
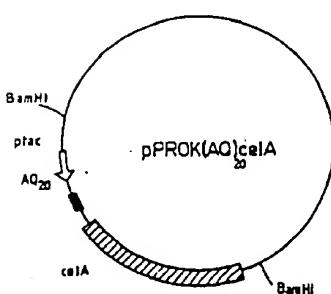
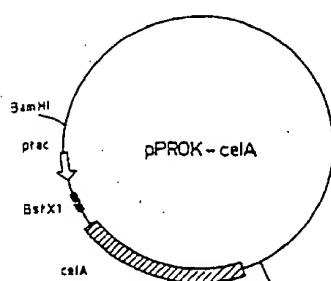


DGF1 : 32 mer  
5' AATCCATGGCAATGGCGGCCGTCGACCCC 3'

DGF2 : 28 mer  
5' GGGGTGGACAGGCCGGGATTGCCATGG 3'

DGF3 : 120 mer  
5' CAGGCACAGGCTCAGGCCAGGGCACAGGCCAGGGCAGGG  
CCCCAGGCCAGGGCTAGGCACAGGCCAGGCCAGGGCAGGCCA  
GGCACAGGCCAGGGCTCAGGCCAGGCCAGGGCTCAGGCCA 3'

DGF4 : 120 mer  
5' TGACCTTGAAGCTGC3CCTGAGCTTGCTGCTGCTGCG  
CTGCGCTCGCGCTGAGCTGAGCTGCGCGCTGCGCTG  
CGCTGCGCTGCGCTGAGCTGCGCTGCGCTGCGCTGCG 3'

**FIG.19**

平成 5 年 8 月 22 日

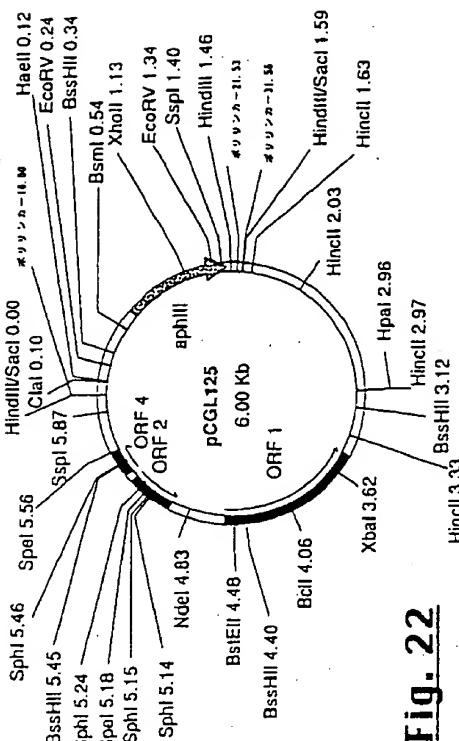


Fig. 22

特許庁長官 庫生 賀風

1 事件の表示  
平成 5 年 特許署 第 503324 号  
PCT/FR 92/00744

2 発明の名称  
特にコリネバクテリア中で用いることできる  
医薬成分の発現および分離系

3 换正をする者  
事件との関係 特許出願人  
オルサン

4 代理人 (郵便番号 100)  
東京都千代田区丸の内三丁目 2 錄 3 号  
〔電話東京 (3211)2321 大代表〕  
6428 フ瑞士 佐藤一

5 换正命令の日付  
発送日 平成 年 月 日

6 换正の対象  
特許法第 184 条の 5 項に  
とる著者の権利、権利者、権利の存続状況及び  
法人登録書、明細書、請求書、特許登録証明書等

7 换正の内容  
1) 別紙の通り  
(引取請求書の記載事項、特許登録証明書等の件数  
又は提出するものに記載なし)

特許庁  
5.23  
国際出願

国際出願報告		
International application No. PCT/FR 92/00744		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.C11 S C12M13/77; C12M13/82; C12M13/90 C07K13/00; C07K13/00; A61K39/40 According to International Patent Classification (IPC) or to both Standard International and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Microorganisms used for transformation by or addition by recombination methods		
Int.C11 S C12M C07K		
Classification reported other than main-class documents outside the extent that such documents are included in the fields searched		
References not having claimed any international search (name of document and, where possible, source name and)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, also indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to sheet No.
A	WO A 8 809 831 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 13 December 1988 ---	1-34
A	EP-A-1 279 492 (ASAMI KASEI KOGYO KAGOSHIMA KENSHO)	1-34
A	BIO/TECHNOLOGY vol. 6, No.6, June 1990, NATURE AMERICA, ISSN 0028 359 561 R.-A. PCTET ET AL. "Hypersecretion of a cellulase from celluloidum thermocellum in bacterium subtilis by induction of chromosome dna replication"	1-34
	-/-	
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of this C. <input type="checkbox"/> An patent family exist.		
<p><sup>1</sup>* Special arrangement of cited documents The cited documents are not part of the art which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>2</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>3</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>4</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>5</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>6</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>7</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>8</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>9</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>10</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>11</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>12</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>13</sup>* The cited documents are not part of the basic research which is now considered to be of particular interest.</p> <p><sup>14</sup>* Document supplier of the cited patent family</p>		
Date of the earliest conception of the international search 19 October 1992 (39.10.92)		Date of mailing of the international search report 4 November 1993 (04.11.93)
Name and mailing address of the DPA/ European Patent Office Postnach 30		Authorized officer Telephone No. Fax No. PCT/FR/1216 (concession of second sheet) (July 1993)

国際出願報告		
International application No. PCT/FR 92/00744		
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Reference to sheet No.
A	BIO/TECHNOLOGY vol. 6, No.1, January 1991, NATURE Academic INC., NEW YORK; US ISSN 0028 359 561 A. SCHWABE AND A. PFWLER "Manipulation of Corynebacterium glutamicum by gene disruption and replacement"	1-34

国際特許報告

Patent document number reported	Publication date	Patent family number	Publication date
WO-A-8003821	16-12-88	US-A- 4965197	23-10-90
FR-A-1575492	04-07-88	JP-A- 61268105	27-11-88

For more details about this report, see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/88

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.<sup>5</sup> 謙別記号 廣内整理番号 F I

C 12 N 15/90  
 C 12 P 21/00  
 21/08  
 //C 12 N 1/21  
 C 12 R 1:13  
 (C 12 N 1/21  
 C 12 R 1:15)  
 (C 12 P 21/00  
 C 12 R 1:13)  
 (C 12 P 21/00  
 C 12 R 1:15)

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL,  
 SE), JP, US

(72) 発明者 デュシロン, フランシス  
 フランス國アポン、リュ、メルモ、25、レ  
 ジダンス、ラ、フォンテーヌ、オ、ボワ  
 ルノー、ミシェル

(72) 発明者 レブロン, ジエラール  
 フランス國レ、ジュリ、アレー、デ、バー  
 ト、5